

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
30 novembre 2000 (30.11.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 00/71078 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: **A61K**

Philippe [FR/FR]; 3, rue Kirschleger, F-67000 Stras-  
bourg (FR). JUND, Richard [FR/FR]; 42, rue de Soultz,  
F-67100 Strasbourg (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/01422

(74) Mandataire: CABINET GERMAIN ET MAUREAU;  
Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).

(22) Date de dépôt international: 25 mai 2000 (25.05.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(81) États désignés (*national*): AU, CA, JP, US.

(26) Langue de publication: français

(84) États désignés (*régional*): brevet européen (AT, BE, CH,  
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE).

(30) Données relatives à la priorité:  
99/06892 25 mai 1999 (25.05.1999) FR

Publiée:

— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport.

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*): TRANS-  
GENE [FR/FR]; 11, rue de Mosheim, F-67000 Strasbourg  
(FR).

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.*

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): ERBS,

(54) Title: COMPOSITION DESIGNED FOR IMPLEMENTING AN ANTITUMORAL OR ANTIVIRAL TREATMENT IN A  
MAMMAL

(54) Titre: COMPOSITION DESTINÉE A LA MISE EN OEUVRE D'UN TRAITEMENT ANTITUMORAL OU ANTIVIRAL  
CHEZ UN MAMMIFÈRE

(57) Abstract: The invention concerns a composition for implementing an antitumoral or antiviral treatment in a mammal compris-  
ing: (i) a nucleic acid sequence coding for all or part of polypeptide p53; (ii) at least a nucleic acid sequence coding for all or part  
of a polypeptide having at least a cytotoxic activity, said nucleic acid sequences being placed under the control of elements required  
for their expression in a host cell of said mammal.

(57) Abrégé: La présente invention concerne une composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement antitumoral ou antiviral  
chez un mammifère comprenant: (i) une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie du polypeptide p53, (ii) au moins une  
séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique, lesdites séquences  
d'acide nucléique étant placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte dudit mammifère.

Composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement  
antitumoral ou antiviral chez un mammifère

La présente invention concerne une composition  
cytotoxique comprenant une première séquence d'acide  
5 nucléique codant pour tout ou partie de la protéine p53 et  
une seconde séquence d'acide nucléique codant pour tout ou  
partie d'un polypeptide ayant au moins une activité  
cytotoxique, notamment antitumorale ou antivirale. La présente  
invention est particulièrement utile dans le cadre de la  
10 mise en oeuvre d'un traitement par thérapie génique de  
maladies prolifératives ou infectieuses.

La p53 est une phosphoprotéine nucléaire  
intervenant notamment dans le contrôle de l'expression des  
protéines impliquées dans le cycle cellulaire (Ozbun et  
15 al, 1995, Adv. Cancer Res. 66, 71-141- Selter et al, 1994,  
Int. J. Biochem. 26, 145-154) et participant à de nombreux  
processus cellulaires liés à la stabilité du génome et à  
l'apoptose cellulaire (Harris et al, 1996, J. Natl. Cancer  
Inst. 88, 1442-1445 ; Kastan et al, 1991, Cancer Res. 51,  
20 6304-6311 ; Kuerbitz et al, 1992, PNAS, 89, 7491-7495).

Le gène p53 a été identifié et séquencé. La  
séquence du cDNA est décrite dans Matlashewski et al.,  
1984, EMBO J., 3, 3257-3262 et celle de la protéine dans  
Lamp, 1986, Mol. Cell Biol., 6, 1379-1385. De même, des  
25 variants polymorphiques naturels et fonctionnels ont été  
identifiés pour lesquels certains amino acides sont  
remplacés par d'autres sans toutefois affecter la fonction  
p53. Par ailleurs, de nombreuses mutations ont été  
décrites dans la littérature relative au cancer qui  
30 peuvent se traduire par une perte de la fonction de cette  
protéine (Holstein et al, 1991, Science, 253, 49-53 ;  
Levine et al, 1991, Nature, 351, 453-456). Par exemple,  
Baker et al, (1989, Science, 244, 217) ont constaté que  
dans plus de 70% des tumeurs colorectales la fonction de  
35 ce gène p53 est perdue.

Par ailleurs, plusieurs études *in vitro* ont montré que la restauration de l'activité p53 dans les cellules déficientes pour cette activité permet de supprimer la croissance cellulaire ou d'induire l'apoptose des cellules

5 (Baker et al, 1990, Science, 249, 912-915 ; Shaw et al, 1992, PNAS, 89, 4495-4499). De façon similaire, plusieurs études ont confirmé qu'il est possible de supprimer *in vivo* la croissance des cellules tumorales par l'application d'une thérapie visant à restaurer de

10 l'activité du gène p53 défectueux (Fujiwara et al, 1994, J. Natl. Cancer Inst. 86, 1458-1462 ; Wills et al, 1994, Hum. Gene Therapy, 5, 1079-1088 ; Hamada et al, 1996, Cancer Res. 56, 3047-3054).

En outre, faisant suite aux travaux de Lowe et al.

15 (1993, Cell 74, 957-967, 1994, Science 266, 807-810) mettant en évidence une résistance accrue de cellules tumorales n'exprimant pas le gène p53 à l'égard de différents types d'agents cytotoxiques et radiations, l'utilisation de la protéine p53 fonctionnelle, ou de son

20 gène, a été envisagée afin de développer une méthode de sensibilisation des cellules tumorales auxdits agents. Plus particulièrement, il a été montré que la transfection d'une cellule tumorale humaine de colon dont le gène p53 est rendu inactif par mutation avec un plasmide exprimant

25 le gène p53 sauvage permet *in vitro* de sensibiliser cette cellule au 5-Fluorouracile (5-FU) (Yang et al, 1996, Clin. Cancer. Res. 2, 1649-1657).

Nous avons maintenant mis en évidence de nouvelles compositions cytotoxiques dont les différents constituants

30 sont choisis de façon à obtenir un effet synergique de leurs activités respectives et des propriétés améliorées desdits constituants. Plus particulièrement, de telles compositions permettent d'inhiber ou de retarder la prolifération cellulaire en induisant la mort spécifique

35 des cellules tumorales, une meilleure présentation des antigènes et/ou une stimulation des cellules immunes de

l'organisme hôte. La présente invention offre une alternative avantageuse et efficace aux techniques de l'art antérieur, notamment pour traiter le cancer de l'homme ou de l'animal.

5 L'invention concerne en premier lieu une composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement antitumoral ou antiviral, ou toute applications nécessitant la mort cellulaire, chez un mammifère comprenant :

10 (i) une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie du polypeptide p53,

(ii) au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique,

15 lesdites séquences d'acide nucléique étant placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte dudit mammifère.

Dans le cadre de la présente invention, il est possible d'utiliser en (i) l'intégralité de la séquence  
20 d'acide nucléique codant pour le polypeptide p53 ou une partie seulement de ce polypeptide, ou un polypeptide dérivé ou muté, dans la mesure où la fonction de p53 est conservée. De telles séquences sont bien connues de l'homme du métier et il est possible de se référer par  
25 exemple à Matlashewski et al., 1984, EMBO J., 3, 3257-3262, Prives et al., 1994, Cell, 78, 543-546 ou Chen et al., 1996, Gene et Deve., 10, 2438-2451, dont les contenus sont incorporés dans la présente demande.

Par « polypeptide ayant au moins une activité  
30 cytotoxique », on entend désigner toute substance peptidique susceptible d'induire ou d'activer une réponse immune dirigée spécifiquement contre une cellule tumorale (l'activité cytotoxique est alors appelée activité antitumorale) ou une cellule infectée par un virus  
35 (l'activité cytotoxique est alors appelée activité antivirale) ou d'inhiber la croissance et / ou la division

d'une telle cellule tumorale ou infectée. Selon un cas préféré, ladite activité cytotoxique se traduit par la mort de ladite cellule.

Etant donné les propriétés du polypeptide p53  
5 comme transactivateur transcriptionnel (Farmer et al., 1992, Nature, 358, 83-86) ou comme polypeptide capable d'interagir avec d'autres protéines (Harris, 1996, Carcinogenesis, 17, 1187-1198), l'activité p53 peut être mesurée par l'analyse de l'arrêt du cycle cellulaire en  
10 phase G1/S et G2/M, de l'induction de l'apoptose, de la suppression de la transformation cellulaire induite par les oncogènes ou de l'inhibition de l'angiogénèse.

L'activité cytotoxique d'un polypeptide donné, notamment une activité anti-tumorale, peut être évaluée in  
15 vitro par la mesure de la survie cellulaire soit par des tests de viabilité à court terme (tel que par exemple le test au bleu tryptan ou MTT), soit par des tests de survie clonogénique (formation de colonies) (Brown et Wouters, 1999, Cancer Research, 59, 1391-1399) ou in vivo par la  
20 mesure de la croissance des tumeurs (taille et/ou volume) dans un modèle animal (Ovejera et Houchens, 1981, Semin. Oncol., 8, 386-393).

Selon une première variante, l'invention concerne une composition caractérisée en ce que ledit polypeptide  
25 ayant une activité cytotoxique est choisi parmi les cytokines, les protéines codées par un gène appelé « gène suicide » et les facteurs protéiques antiangiogéniques.

Plus particulièrement, lorsque ledit polypeptide en (ii) est une cytokine, il s'agit préférentiellement  
30 d'une cytokine choisie parmi les interférons  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , les interleukines, et notamment l'IL-2, l'IL-4 l'IL-6, l'IL-10 ou l'IL-12, les facteurs nécrosant des tumeurs (TNF) et les facteurs stimulateurs de colonies (GM-CSF, C-CSF, M-CSF...).

35 Selon un mode de réalisation préféré, ladite cytokine est sélectionnée parmi l'interleukine-2 (IL-2) et

l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ). L'interleukine-2 est notamment responsable de la prolifération des lymphocytes T activés, de la multiplication et de l'activation des cellules du système immunitaire (pour la séquence en acide nucléique voir notamment FR 85 09480). L'IFN- $\gamma$  active les cellules phagocytaires et accroît l'expression des antigènes de surfaces de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité (pour la séquence en acide nucléique voir notamment FR 85 09225).

10 Selon une seconde variante, l'invention concerne également une telle composition caractérisée en ce que ledit polypeptide en (ii) présente au moins une activité enzymatique sélectionnée parmi l'activité thymidine kinase, l'activité purine nucleoside phosphorylase, 15 l'activité guanine ou uracile ou orotate phosphoribosyl transférase et l'activité cytosine désaminase.

Plusieurs études ont permis d'identifier des polypeptides qui ne sont pas toxiques en tant que tels mais qui présentent des propriétés enzymatiques catalytiques capables de transformer une substance 20 inactive (prédrogue), par exemple un nucléoside ou un analogue de nucléoside, en substance hautement toxique pour la cellule, par exemple un nucléoside modifié qui peut être incorporé dans les chaînes d'ADN ou d'ARN en 25 élongation, avec pour conséquence, notamment, l'inhibition de la division cellulaire ou des dysfonctionnements cellulaires conduisant à la mort de la cellule renfermant de tels polypeptides. Les gènes codant pour de tels polypeptides sont dits « gènes suicides ». De nombreux 30 couples gène suicide / prédrogue sont actuellement disponibles. On peut citer plus particulièrement, les couples :

- la thymidine kinase du virus herpès simplex de type 1 (TK HSV-1) et l'acyclovir ou le ganciclovir 35 (GCV) (Caruso et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90,

7024-7028 ; Culver et al., 1992, Science 256, 1550-1552 ;  
Ram et al., 1997, Nat. Med. 3, 1354-1361) ;

- le cytochrome p450 de rat et la  
cyclophosphamide (Wei et al., 1994, Human Gene Therapy  
5 5, 969-978) ;

- la purine nucleoside phosphorylase d'*Escherichia coli* (*E. Coli*) et la 6-methylpurine deoxyribonucleoside  
(Sorscher et al., 1994, Gene Therapy 1, 233-238) ;

- la guanine phosphoribosyl transférase d'*E. coli*  
10 et la 6-thioxanthine (Mzoz et Moolten, 1993, Human Gene  
Therapy 4, 589-595) et

- la cytosine désaminase (CDase) et la 5-  
fluorocytosine (5FC).

Plus particulièrement, la CDase est un enzyme qui  
15 intervient dans la voie métabolique des pyrimidines par  
laquelle la cytosine exogène est transformée par le biais  
d'une désamination hydrolytique en uracile. Des activités  
CDases ont été mises en évidence chez les procaryotes et  
les eucaryotes inférieurs (Jund et Lacroute, 1970, J.  
20 Bacteriol. 102, 607-615 ; Beck et al., 1972, J. Bacteriol.  
110, 219-228 ; De Haan et al., 1972, Antonie van  
Leeuwenhoek 38, 257-263 ; Hoeprich et al., 1974, J. Inf.  
Dis. 130, 112-118 ; Esders et Lynn, 1985, J. Biol. Chem.  
260, 3915-3922) mais elles sont absentes chez les  
25 mammifères (Koechlin et al., 1966, Biochem Pharmacol. 15,  
435-446 ; Polak et al., 1976, Chemotherapy 22, 137-153).  
Les gènes *FCY1* de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)  
et *codA* d'*E. coli* codant respectivement pour la CDase de  
ces deux organismes sont connus et leurs séquences  
30 publiées (EP 402 108 ; Erbs et al., 1997, Curr. Genet. 31,  
1-6 ; WO93/01281).

La CDase désamine également un analogue de la  
cytosine, la 5-fluorocytosine (5-FC) en 5-fluorouracile  
(5-FU) qui est un composé hautement cytotoxique notamment  
35 lorsqu' il est converti en 5-fluoro-UMP (5-FUMP). Les  
cellules dépourvues d'activité CDase, en raison soit d'une

mutation inactivante du gène codant pour l'enzyme, soit de leur déficience naturelle pour cette enzyme (par exemple les cellules mammifères) sont résistantes au 5-FC (Jund et Lacroute, 1970, J. Bacteriol. 102, 607-615 ; Kilstrup et al., 1989, J. Bacteriol. 1989 171, 2124-2127). Par contre, il a été montré qu'il est possible de transmettre la sensibilité au 5-FC à des cellules mammifères dans lesquelles la séquence codant pour une activité CDase a été transférée (Huber et al., 1993, Cancer Res. 53, 4619-4626 ; Mullen et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 33-37 ; WO 93/01281). De plus, dans ce cas, les cellules avoisinantes non transformées deviennent également sensibles au 5-FC (Huber et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 8302-8306). Ce phénomène, appelé effet de voisinage (bystander en anglais), est dû à l'excrétion par les cellules exprimant l'activité CDase, de 5-FU qui intoxique les cellules voisines par simple diffusion à travers la membrane cellulaire. Cette propriété de diffusion passive du 5-FU constitue un avantage par rapport au système de référence tk/GCV pour lequel l'effet de voisinage nécessite un contact avec les cellules qui expriment tk (Mesnil et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1831-1835). Cet effet constitue par conséquent un atout supplémentaire de l'utilisation de la CDase dans le cadre de la thérapie génique, notamment anticancéreuse.

Cependant, la sensibilité au 5-FC varie beaucoup selon les lignées cellulaires. Une faible sensibilité est observée par exemple dans des lignées tumorales humaines PANC-1 (carcinome de pancréas) et SK-BR-3 (adénocarcinome du sein) transduites par un rétrovirus exprimant le gène *codA* d'*E. Coli* (Harris et al., 1994, Gene Therapy 1, 170-175). Ce phénomène indésirable pourrait s'expliquer par l'absence ou la faible conversion endogène du 5-FU formé par l'action enzymatique de la CDase en 5-FUMP cytotoxique. Cette étape, normalement assurée dans les cellules mammifères par l'orotate phosphorybosyl



transférase (Peters et al., 1991, Cancer 68, 1903-1909), peut être absente dans certaines tumeurs et rendre ainsi la thérapie génique, basée sur la CDase, inopérante.

Chez les procaryotes et eucaryotes inférieurs, 5 l'uracile est transformée en UMP par l'action de l'uracile phosphoribosyl transférase (présentant par conséquent une activité UPRTase). Cette enzyme convertit également le 5-FU en 5-FUMP. Ainsi des mutants *fur1* de la levure *S. cerevisiae* sont résistants à de fortes concentrations de 10 5-FU (10 mM) et de 5-FC (10 mM) car en absence d'activité UPRTase, le 5-FU, provenant de la désamination du 5-FC par la CDase, n'est pas transformé en 5-FUMP cytotoxique (Jund et Lacroute, 1970, J. Bacteriol. 102, 607-615). Les gènes *upp* et *FUR1* codant pour l'UPRTase respectivement d'*E. coli* 15 et de *S. cerevisiae* ont été clonés et séquencés (Andersen et al., 1992, Eur. J. Biochem. 204, 51-56 ; Kern et al., 1990, Gene 88, 149-157).

Au sens de la présente invention, un polypeptide ayant une activité UPRTase désigne un polypeptide capable 20 de convertir l'uracile ou un de ses dérivés en un analogue monophosphaté et, en particulier la 5-FU en 5-FUMP. Par «mutation», il faut entendre l'addition, la délétion et/ou la substitution d'un ou plusieurs résidus à un endroit quelconque dudit polypeptide.

25 L'UPRTase native dont il est question dans la présente invention peut être d'une origine quelconque, notamment procaryotique, fongique ou de levure. A titre illustratif, les séquences d'acide nucléique codant pour les UPRTases d'*E. coli* (Anderson et al., 1992, Eur. J. 30 Biochem 204, 51-56), de *Lactococcus lactis* (Martinussen et Hammer, 1994, J. Bacteriol. 176, 6457-6463), de *Mycobacterium bovis* (Kim et al., 1997, Biochem Mol. Biol. Int 41, 1117-1124) et de *Bacillus subtilis* (Martinussen et al., 1995, J. Bacteriol. 177, 271-274) peuvent être 35 utilisées dans le cadre de l'invention. Mais on préfère tout particulièrement mettre en oeuvre une UPRTase de

levure et notamment celle codée par le gène *FUR1* de *S. cerevisiae* dont la séquence divulguée dans Kern et al. (1990, Gene 88, 149-157) est introduite ici par référence. A titre indicatif, les séquences des gènes et celles des  
5 UPRTases correspondantes peuvent être trouvées dans la littérature et les banques de données spécialisées (SWISSPROT, EMBL, Genbank, Medline...).

Par ailleurs, la demande PCT/FR99/00904 décrit un gène *FUR1* dépourvu de 105 nucléotides en 5' de la partie  
10 codante permettant la synthèse d'une UPRTase délétée des 35 premiers résidus en position N-terminale et débutant à la méthionine en position 36 dans la protéine native. Le produit d'expression du gène mutant, désigné *FUR1Δ105*, est capable de compléter un mutant *fur1* de *S. cerevisiae*.  
15 En outre, le mutant tronqué présente une activité UPRTase supérieure à celle de l'enzyme native. Ainsi, selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, le polypeptide codé selon l'invention est un mutant de délétion d'une UPRTase native. La délétion est de  
20 préférence localisée dans la région N-terminale de l'UPRTase d'origine. Elle peut être totale (concerner l'ensemble des résidus de ladite région N-terminale) ou partielle (concerner un ou plusieurs résidus continus ou non dans la structure primaire). D'une manière générale,  
25 un polypeptide est constitué de parties N-terminale, centrale et C-terminale, chacune représentant environ le tiers de la molécule. Par exemple, l'UPRTase de *S. cerevisiae* ayant 251 acides aminés, sa partie N-terminale est constituée des 83 premiers résidus débutant à la  
30 méthionine dite initiatrice située en première position de la forme native. Quant à l'UPRTase d'*E. coli*, sa partie N-terminale couvre les positions 1 à 69.

Ainsi, d'une manière tout à fait préférée, le polypeptide selon PCT/FR99/00904 dérive d'une UPRTase  
35 native au moins par délétion de tout ou partie de la région N-terminale en amont du second codon ATG de ladite

UPRTase native. La délétion totale de la région précitée est préférée. Par exemple, l'UPRTase codée par le gène *FUR1* comprend un premier codon ATG (codon ATG initiateur) en position +1 suivi d'un second en position +36. Ainsi, la délétion des résidus +1 à 35 peut être envisagée dans le cadre de la présente invention, donnant un polypeptide débutant à la méthionine trouvée normalement en position +36 de la forme native.

Un polypeptide préféré selon PCT/FR99/00904 comprend une séquence en acides aminés sensiblement telle que représentée à l'identificateur de séquence IDS NO: 1, débutant au résidu Met en position 1 et se terminant au résidu Val en position 216. Le terme « sensiblement » fait référence à un degré d'identité avec ladite séquence IDS NO: 1 supérieure à 70%, avantageusement supérieur à 80%, de préférence, supérieure à 90% et, de manière tout à fait préférée, supérieur à 95%. Encore plus préférentiellement, il comprend la séquence en acides aminés représentée à l'identificateur de séquence IDS NO: 1. Comme mentionné ci-dessus, il peut comporter des mutations supplémentaires. On peut citer notamment la substitution du résidu sérine en position 2 (position 37 dans l'UPRTase native) par un résidu alanine.

En outre, les demandes de brevet WO96/16183 et PCT/FR99/00904 décrivent l'utilisation d'une protéine de fusion codant pour une enzyme à deux domaines ayant les activités CDase et UPRTase et démontrent que le transfert d'un gène hybride *codA::upp* ou *FCY1::FUR1* ou *FCY1::FUR1Δ105* porté par un plasmide d'expression augmente la sensibilité au 5-FC de cellules B16 transfectées. Les séquences protéiques et nucléiques décrites dans ces deux demandes sont incorporées dans la description de la présente demande.

Selon un autre mode de réalisation, le polypeptide selon PCT/FR99/00904 est un polypeptide de fusion dans lequel il est fusionné en phase avec au moins un second

polypeptide. Bien que la fusion puisse avoir lieu à un endroit quelconque du premier polypeptide, les extrémités N ou C-terminales sont préférées et notamment l'extrémité N-terminale. Avantageusement, la fusion en phase met en  
5 oeuvre un second polypeptide présentant une activité cytosine désaminase (CDase) et dérivant d'une cytosine désaminase native, de sorte que le polypeptide de fusion selon l'invention présente les activités CDase et UPRTase. Une fusion FCY1::FUR1 est préférée. Un tel polypeptide  
10 bifonctionnel permet d'améliorer la sensibilité des cellules cibles à la 5-FC et à la 5-FU. De préférence, le second polypeptide selon l'invention est capable de métaboliser la 5-FC en 5-FU.

Selon PCT/FR99/00904, on a recours à une CDase  
15 d'origine procaryote ou eucaryote inférieur. Encore plus préférentiellement, il s'agit d'une CDase de levure et en particulier celle codée par le gène *FCY1* de *Saccharomyces cerevisiae*. Le clonage et la séquence des gènes codant pour les CDases de différentes sources sont disponibles  
20 dans la littérature et les banques de données spécialisées. On indique que la séquence du gène *FCY1* est divulguée dans Erbs et al. (1997, Curr. Genet. 31, 1-6). Il est bien entendu possible d'utiliser un mutant de CDase ayant une capacité de conversion comparable ou supérieure  
25 à celle de l'enzyme native. L'homme de l'art est capable de cloner les séquences CDase à partir des données publiées, de procéder à d'éventuelles mutations, de tester l'activité enzymatique des formes mutantes dans un système acellulaire ou cellulaire selon la technologie de l'art ou  
30 en suivant le protocole indiqué ci-après et de fusionner en phase les polypeptides d'activité CDase et UPRTase.

Un exemple préféré est un polypeptide comprenant une séquence en acides aminés sensiblement telle que représentée à l'identificateur de séquence IDS NO: 2,  
35 débutant au résidu Met en position 1 et se terminant au résidu Val en position 373. Le terme « sensiblement » a la

définition donnée précédemment. Un polypeptide comprenant la séquence en acides aminés telle que représentée à l'identificateur de séquence IDS NO: 2 convient tout particulièrement à la mise en oeuvre de l'invention.

- 5 Une fusion des activités CDase et UPRTase permet d'améliorer la sensibilité des cellules cibles à la 5-FC et à la 5-FU.

L'homme de l'art est capable de cloner les séquences de CDase ou UPRTase à partir des données  
10 publiées, de procéder à d'éventuelles mutations, de tester les activités enzymatiques des formes mutantes dans un système acellulaire ou cellulaire selon la technologie de l'art ou en suivant le protocole indiqué dans la demande PCT/FR99/00904 et de fusionner, notamment en phase, les  
15 polypeptides d'activité CDase et UPRTase, et par conséquent tout ou partie des gènes correspondants.

D'une manière générale, un polypeptide selon l'invention peut être produit par les méthodes conventionnelles de synthèse chimique ou bien par les  
20 techniques de l'ADN recombinant (voir par exemple Maniatis et al., 1989, *Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Ainsi selon le procédé de préparation décrit dans PCT/FR99/00904 on introduit une séquence nucléotidique codant pour ledit  
25 polypeptide dans une cellule pour générer une cellule transformée, on cultive ladite cellule transformée dans des conditions appropriée pour permettre la production dudit polypeptide et on récolte ledit polypeptide à partir de la culture cellulaire. La cellule productrice peut être  
30 d'une origine quelconque et sans limitation, une bactérie, une levure ou bien une cellule de mammifère, dans la mesure où la séquence nucléotidique considérée est soit intégrée dans son génome soit intégrée dans un vecteur d'expression approprié capable de se répliquer. Bien  
35 entendu, la séquence nucléotidique est placée sous le contrôle de signaux de transcription et de traduction

permettant son expression dans la cellule productrice. Vecteurs d'expression et signaux de contrôle sont connus de l'homme du métier. Quant au polypeptide, il peut être récupéré du milieu ou des cellules (après lyse de celles-ci) et soumises à des étapes de purifications classiques (par chromatographie, électrophorèse, filtration, immunopurification etc...).

PCT/FR99/0904 décrit également une séquence nucléotidique codant pour un dit polypeptide qui peut être une séquence ADNc ou génomique ou de type mixte. Elle peut éventuellement contenir un ou plusieurs introns, ceux-ci étant d'origine native, hétérologue (par exemple l'intron du gène  $\beta$ -globine de lapin...) ou synthétiques afin d'augmenter l'expression dans les cellules hôtes. Comme déjà indiqué, ladite séquence peut coder pour un polypeptide dérivant de l'enzyme native ou un mutant présentant une activité comparable ou améliorée. Les séquences employées peuvent être obtenues par les techniques classiques de biologie moléculaire, par exemple par criblage de banque à l'aide de sondes spécifiques, par immunocriblage de banque d'expression, par PCR au moyen d'amorces adéquates ou par synthèse chimique. Les mutants peuvent être générés à partir des séquences natives par substitution, délétion et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides en mettant en oeuvre les techniques de mutagenèse dirigée, de PCR, de digestion par les enzymes de restriction et ligation ou encore par synthèse chimique. La fonctionnalité des mutants et des constructions peut être vérifiée par le dosage de l'activité enzymatique ou par la mesure de la sensibilité de cellules cibles aux 5-FC et/ou 5-FU.

Par conséquent, selon un cas précis, la composition de l'invention est caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique (ii) est sélectionnée parmi les séquences nucléiques des gènes CodA, upp, FUR1, FCY1 et

FUR1Δ105, ou par une combinaison de tout ou partie desdites séquences.

L'invention concerne plus particulièrement une dite composition caractérisée en ce que ledit polypeptide  
5 en (ii) présente au moins une activité CDase et une activité UPRTase.

Par « combinaison de séquences d'acide nucléique » on entend désigner aussi bien des séquences distinctes qui codent pour au moins deux polypeptides distincts que des  
10 séquences fusionnées qui codent pour des polypeptides de fusion, étant entendu que la production de tels polypeptides peut être réalisée sous le contrôle des mêmes éléments de régulation (cassette polycistronique) ou d'éléments indépendants, identiques ou différents,  
15 homologues ou hétérologues vis à vis du vecteur les renfermant, constitutifs ou inductibles.

Selon un mode particulier de réalisation, la composition de l'invention comprend au moins une séquence d'acide nucléique (ii) codant pour un polypeptide de  
20 fusion dans lequel un premier polypeptide présentant une activité UPRTase ou CDase est fusionné en phase avec au moins un second polypeptide, ledit second polypeptide présentant une activité CDase ou UPRTase, respectivement. Plus particulièrement, un tel polypeptide est caractérisé  
25 en ce que la fusion avec le second polypeptide est réalisée à l'extrémité N-terminale dudit premier polypeptide.

Selon un cas préféré, ladite composition est caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique  
30 codant pour ledit polypeptide de fusion est une séquence hybride comprenant :

- une première séquence d'acide nucléique codant pour un premier polypeptide présentant une activité UPRTase ou CDase,

- une seconde séquence d'acide nucléique codant pour un second polypeptide présentant une activité Cdase ou UPRTase, respectivement.

Une telle séquence d'acide nucléique hybride  
5 codant pour ledit polypeptide de fusion peut en outre renfermer une séquence de type IRES.

L'invention concerne notamment une telle composition pour laquelle la première séquence d'acide nucléique est sélectionnée parmi upp, FUR1 et FUR1Δ105, et  
10 en ce que la seconde séquence d'acide nucléique est sélectionnée parmi CodA et FCY1, et vice-versa. De manière tout à fait préférée, une telle séquence d'acide nucléique hybride est choisie parmi les séquences hybrides décrites dans les demandes de brevet WO96/16183 et PCT/FR99/00904.

15 Selon une troisième variante, la composition selon la présente invention est caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une activité cytotoxique (ii) est un facteur protéique anti-angiogénique. L'angiogénèse est le processus responsable de la formation de nouveaux  
20 capillaires à partir du réseau vasculaire déjà existant. Ce processus complexe est finement régulé dans les tissus sains par la balance des effets de nombreux facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques. Cependant, dans certaines pathologies, et notamment lors de la formation  
25 d'une tumeur, ce processus est dérégulé : les facteurs angiogéniques prennent le pas sur les facteurs anti-angiogéniques ce qui permet une vascularisation importante des tumeurs et par voie de conséquence leur développement rapide et / ou l'apparition de métastases. C'est pourquoi,  
30 dans le cadre de la présente invention, un facteur anti-angiogénique est considéré comme étant un agent cytotoxique, notamment antitumoral. Parmi les différents facteurs anti-angiogéniques connus à l'heure actuelle on peut notamment citer l'angiostatine, l'endostatine, le  
35 facteur plaquettaire PF4, la thrombospondine-1, le PRP



(pour Proliferin Related Protein), le VEGI (pour Vascular Endothelial Growth Inhibitor) et l'urokinase.

Les séquences d'acide nucléique (i) ou (ii) peuvent être aisément obtenues par clonage, par PCR ou par  
5 synthèse chimique selon les techniques conventionnelles en usage. Il peut s'agir de gènes natifs ou dérivés de ces derniers par mutation, délétion, substitution et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides. Par ailleurs, leur  
10 séquences sont largement décrites dans la littérature consultable par l'homme de l'art.

La présente invention a également trait à une composition telle que présentée ci-dessus caractérisée en ce que lesdites séquences d'acide nucléique (i) et (ii) sont insérées dans un vecteur recombinant d'origine  
15 plasmidique ou virale, ainsi qu'à un tel vecteur recombinant portant de telles séquences nucléotidiques placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte.

Plus particulièrement, les compositions de  
20 l'invention peuvent comprendre lesdites séquences d'acide nucléique (i) et (ii) insérées dans un même vecteur recombinant ou dans des vecteurs recombinants distincts.

Par « vecteur recombinant » selon l'invention, on entend désigner un vecteur d'origine plasmidique ou  
25 virale, et éventuellement un tel vecteur associé à une ou plusieurs substances améliorant l'efficacité transfectionnelle et / ou la stabilité dudit vecteur et/ou la protection dudit vecteur *in vivo* à l'égard du système immunitaire de l'organisme hôte. Ces substances sont  
30 largement documentées dans la littérature accessible à l'homme de l'art (voir par exemple Felgner et al., 1987, Proc. West. Pharmacol. Soc. 32, 115-121 ; Hodgson et Solaiman , 1996, Nature Biotechnology 14, 339-342 ; Remy et al., 1994, Bioconjugate Chemistry 5, 647-654). A titre  
35 illustratif mais non limitatif, il peut s'agir de polymères, de lipides notamment cationiques, de liposomes,

de protéines nucléaires ou virales ou encore de lipides neutres. Ces substances peuvent être utilisées seules ou en combinaison. Des exemples de tels composés sont notamment disponibles dans les demandes de brevet  
5 WO 98/08489, WO 98/17693, WO 98/34910, WO 98/37916, WO 98/53853, EP 890362 ou WO 99/05183. Une combinaison envisageable est un vecteur recombinant plasmidique associé à des lipides cationiques (DOGS, DC-CHOL, spermine-chol, spermidine-chol etc...) et des lipides  
10 neutres (DOPE).

Le choix des plasmides utilisables dans le cadre de la présente invention est vaste. Il peut s'agir de vecteurs de clonage et/ou d'expression. D'une manière générale, ils sont connus de l'homme de l'art et nombre  
15 d'entre eux sont disponibles commercialement mais il est également possible de les construire ou les modifier par les techniques de manipulation génétique. On peut citer à titre d'exemples les plasmides dérivés de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagène), pREP4,  
20 pCEP4 (Invitrogene) ou encore p Poly (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201). De préférence, un plasmide mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention contient une origine de réplication assurant l'initiation de la réplication dans une cellule productrice et/ou une cellule  
25 hôte (par exemple, on retiendra l'origine ColE1 pour un plasmide destiné à être produit dans *E. coli* et le système oriP/EBNA1 si l'on désire qu'il soit autorépliatif dans une cellule hôte mammifère, Lupton et Levine, 1985, Mol. Cell. Biol. 5, 2533-2542 ; Yates et al., Nature 313, 812-  
30 815). Il peut en outre comprendre un gène de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules transfectées (complémentation d'une mutation d'auxotrophie, gène codant pour la résistance à un antibiotique...). Bien entendu, il peut comprendre des  
35 éléments supplémentaires améliorant son maintien et/ou sa stabilité dans une cellule donnée (séquence cer qui

favorise le maintien monomérique d'un plasmide (Summers et Sherratt, 1984, Cell 36, 1097-1103, séquences d'intégration dans le génome cellulaire).

S'agissant d'un vecteur viral, on peut envisager  
5 un vecteur dérivant d'un poxvirus (virus de la vaccine, notamment MVA, canaripox... etc), d'un adénovirus, d'un rétrovirus, d'un virus de l'herpès, d'un alphavirus, d'un foamyvirus ou d'un virus associé à l'adénovirus. On aura de préférence recours à un vecteur non réplcatif et non  
10 intégratif. A cet égard, les vecteurs adénoviraux conviennent tout particulièrement à la mise en oeuvre de la présente invention. Toutefois, il convient de noter ici que dans le cadre de la mise en oeuvre de la présente invention, la nature du vecteur revêt peu d'importance.

15 Les rétrovirus ont la propriété d'infecter et de s'intégrer majoritairement dans les cellules en division et à cet égard sont particulièrement appropriés pour l'application cancer. Un rétrovirus recombinant selon l'invention comporte généralement les séquences LTR, une  
20 région d'encapsidation et la séquence nucléotidique selon l'invention placée sous le contrôle du LTR rétroviral ou d'un promoteur interne tels que ceux décrits ci-après. Il peut dériver d'un rétrovirus d'une origine quelconque (murin, primate, félin, humain, etc.) et en particulier du  
25 MoMuLV (Moloney murine leukemia virus), MVS (Murine sarcoma virus) ou Friend murine retrovirus (Fb29). Il est propagé dans une lignée d'encapsidation capable de fournir en trans les polypeptides viraux gag, pol et/ou env nécessaires à la constitution d'une particule virale. De  
30 telles lignées sont décrites dans la littérature (PA317, Psi CRIP GP + Am-12 etc...). Le vecteur rétroviral selon l'invention peut comporter des modifications notamment au niveau des LTR (remplacement de la région promotrice par un promoteur eucaryote) ou de la région d'encapsidation  
35 (remplacement par une région d'encapsidation hétérologue,

par exemple de type VL30) (voir les demandes françaises 94 08300 et 97 05203).

On pourra également avoir recours à un vecteur adénoviral défectif pour la répllication c'est à dire  
5 dépourvu de tout ou partie d'au moins une région essentielle à la répllication sélectionnée parmi les régions E1, E2, E4 et. Une délétion de la région E1 est préférée. Mais elle peut être combinée à d'autres modification(s) / délétion(s) touchant notamment tout ou  
10 partie des régions E2, E4 et/ou L1-L5, dans la mesure où les fonctions essentielles défectives sont complémentées en trans au moyen d'une lignée de complémentation et/ou d'un virus auxiliaire afin d'assurer la production des particules virales d'intérêt. A cet égard, on peut avoir  
15 recours aux vecteurs de seconde génération de l'état de la technique (voir par exemple les demandes internationales WO 94/28152 et WO 97/04119). A titre illustratif, la délétion de la majorité de la région E1 et de l'unité de transcription E4 est tout particulièrement avantageuse.  
20 Dans le but d'augmenter les capacités de clonage, le vecteur adénoviral peut en outre être dépourvu de tout ou partie de la région E3 non essentielle. Selon une autre alternative, on peut mettre en oeuvre un vecteur adénoviral minimal retenant les séquences essentielles à  
25 l'encapsidation, à savoir les ITRs (Inverted Terminal Repeat) 5' et 3' et la région d'encapsidation. Par ailleurs, l'origine du vecteur adénoviral selon l'invention, peut être variée aussi bien du point de vue de l'espèce que du sérotype. Il peut dériver du génome  
30 d'un adénovirus d'origine humaine ou animale (canine, aviaire, bovine, murine, ovine, porcine, simienne...) ou encore d'un hybride comprenant des fragments de génome adénoviral d'au moins deux origines différentes. On peut citer plus particulièrement les adénovirus CAV-1 ou CAV-2  
35 d'origine canine, DAV d'origine aviaire ou encore Bad de type 3 d'origine bovine (Zakharchuk et al., Arch. Virol.,

1993, 128: 171-176 ; Spibey et Cavanagh, J. Gen. Virol., 1989, 70: 165-172 ; Jouvenne et al., Gene, 1987, 60: 21-28 ; Mittal et al., J. Gen. Virol., 1995, 76: 93-102). Cependant, on préférera un vecteur adénoviral d'origine humaine dérivant de préférence d'un adénovirus de sérotype C, notamment de type 2 ou 5. Un vecteur adénoviral selon la présente invention peut être généré in vitro dans Escherichia coli (E. coli) par ligation ou recombinaison homologue (voir par exemple la demande internationale WO 96/17070) ou encore par recombinaison dans une lignée de complémentation. Les différents vecteurs adénoviraux ainsi que leurs techniques de préparation sont connus (voir par exemple Graham et Preveet, 1991, in Methods in Molecular Biology, vol 7, p 109-128 ; Ed : E.J. Murey, The Human Press Inc).

Les éléments nécessaires à l'expression sont constitués par l'ensemble des éléments permettant la transcription de la séquence nucléotidique en ARN et la traduction de l'ARNm en polypeptide, notamment les séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule, et éventuellement les séquences requises pour permettre l'excrétion ou l'expression à la surface des cellules cibles dudit polypeptide. Ces éléments peuvent être régulables ou constitutifs. Bien entendu, le promoteur est adapté au vecteur retenu et à la cellule hôte. On peut citer, à titre d'exemples, les promoteurs eucaryotes des gènes PGK (Phospho Glycérate Kinase), MT (metallothioneine ; Mc Ivor et al., 1987, Mol. Cell Biol. 7, 838-848),  $\alpha$ -1 antitrypsine, CFTR, les promoteurs du gène codant pour la créatine kinase musculaire, pour l'actine, pour le surfactant pulmonaire, immunoglobuline,  $\beta$ -actine (Tabin et al., 1982, Mol. Cell Biol. 2, 426-436), SR $\alpha$  (Takebe et al., 1988, Mol. Cell. Biol. 8, 466-472), le promoteur précoce du virus SV40 (Simian Virus), le LTR du RSV (Rous Sarcoma Virus), le promoteur de MPSV, le promoteur TK-HSV-

1, le promoteur précoce du virus CMV (Cytomegalovirus), les promoteurs du virus de la vaccine p7.5K pH5R, pK1L, p28, p11 et les promoteurs adénoviraux ElA et MLP ou une combinaison desdits promoteurs. Il peut également s'agir d'un promoteur stimulant l'expression dans une cellule tumorale ou cancéreuse. On peut citer notamment les promoteurs des gènes MUC-1 surexprimé dans les cancers du sein et de la prostate (Chen et al., 1995, J. Clin. Invest. 96, 2775-2782), CEA (pour carcinoma embryonic antigen) surexprimé dans les cancers du colon (Schrewe et al., 1990, Mol. Cell. Biol. 10, 2738-2748), tyrosinase surexprimé dans les mélanomes (Vile et al., 1993, Cancer Res. 53, 3860-3864), ERB-2 surexprimé dans les cancers du sein et du pancréas (Harris et al., 1994, Gene Therapy 1, 170-175) et  $\alpha$ -fétoprotéine surexprimée dans les cancers du foie (Kanai et al., 1997, Cancer Res. 57, 461-465). Le promoteur précoce du Cytomégalo virus (CMV) est tout particulièrement préféré. Il est également possible d'utiliser une région promotrice tissu-spécifique, notamment lorsque la tumeur à traiter est issue d'un type cellulaire particulier, ou activable dans des conditions définies. La littérature procure un grand nombre d'informations relatives à de telles séquences promotrices.

25 Les éléments nécessaires peuvent, en outre, inclure des éléments additionnels améliorant l'expression de la séquence nucléotidique selon l'invention ou son maintien dans la cellule hôte. On peut citer notamment les séquences introniques (WO 94/29471), séquences signal de sécrétion, séquences de localisation nucléaire, sites 30 internes de réinitiation de la traduction de type IRES, séquences poly A de terminaison de la transcription.

Selon un mode de réalisation préféré, l'invention concerne plus particulièrement un vecteur recombinant, 35 notamment un vecteur adénoviral défectif pour la réplication, comprenant :

(i) une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie du polypeptide p53,

(ii) au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins  
5 une activité cytotoxique,

lesdites séquences d'acide nucléique étant placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte et étant définies comme indiqué ci-dessus.

10 La présente invention a également pour objet une particule virale, notamment adénovirale, comprenant un vecteur viral recombinant selon l'invention. Une telle particule virale peut être générée à partir d'un vecteur viral selon toute technique conventionnelle dans le  
15 domaine de l'art. Sa propagation est effectuée notamment dans une cellule de complémentation adaptée aux déficiences du vecteur. S'agissant d'un vecteur adénoviral, on aura par exemple recours à une lignée de complémentation telle que décrite dans la demande  
20 WO 94/28152, à la lignée 293 établie à partir de cellules de rein embryonnaire humain, qui complémente efficacement la fonction E1 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72), la lignée A549-E1 (Imbler et al., 1996, Gene Therapy 3, 75-84) ou une lignée permettant une double  
25 complémentation (Yeh et al., 1996, J. Virol. 70, 559-565 ; Krougliak et Graham, 1995, Human Gene Therapy 6, 1575-1586 ; Wang et al., 1995 Gene Therapy 2, 775-783 ; demande internationale WO 97/04119). On peut également employer des virus auxiliaires pour complémenter au moins en partie  
30 les fonctions défectives. Par cellule de complémentation, on entend une cellule capable de fournir en trans les facteurs précoces et/ou tardifs nécessaires à l'encapsidation du génome viral dans une capside virale pour générer une particule virale contenant le vecteur  
35 recombinant. Ladite cellule peut ne pas complémenter à elle seule toutes les fonctions défectives du vecteur et

dans ce cas peut être transfectée / transduite par un vecteur / virus auxiliaire apportant les fonctions complémentaires.

L'invention concerne également un procédé de  
5 préparation d'une particule virale, selon lequel :

(i) on introduit un vecteur recombinant selon l'invention dans une cellule, notamment une cellule de complémentation capable de compléter *en trans* ledit vecteur, de manière à obtenir une dite cellule  
10 transfectée,

(ii) on cultive ladite cellule transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule virale, et

(iii) on récupère ladite particule virale dans la  
15 culture cellulaire.

Bien entendu, la particule virale peut être récupérée du surnageant de culture mais également à partir des cellules. Une des méthodes couramment employée consiste à lyser les cellules par des cycles consécutifs  
20 de congélation / décongélation pour recueillir les virions dans le surnageant de lyse. Ceux-ci peuvent être amplifiés et purifiés selon les techniques de l'art (procédé chromatographique, ultracentrifugation notamment à travers un gradient de chlorure de césium...).

25 L'invention a également trait à une cellule hôte eucaryote comprenant les fragments d'ADN présents dans la composition selon l'invention. Ladite cellule hôte est avantageusement une cellule de mammifère et, de préférence, une cellule humaine. Il s'agira de préférence  
30 d'une cellule 293, LCA4 ou PERC6. Une telle cellule est notamment utile pour produire les particules virales à haut titre, sans générer de particules compétentes pour la réplication. L'invention concerne également une cellule hôte comprenant une séquence nucléotidique, un vecteur  
35 recombinant selon l'invention ou infectée par une particule virale selon l'invention. Aux fins de la



présente invention, une cellule hôte est constituée par toute cellule transfectable par un vecteur recombinant ou infectable par une particule virale, tels que définis ci-avant. Une cellule de mammifère et notamment humaine  
5 convient tout particulièrement. Elle peut comprendre ledit vecteur sous forme intégrée dans le génome ou non (épisode). Il peut s'agir d'une cellule primaire ou tumorale d'une origine quelconque, notamment  
10 hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte ou macrophage...), musculaire (cellule satellite, myocyte, myoblaste, muscle lisse...), cardiaque, pulmonaire, trachéale, hépatique, épithéliale ou fibroblaste.

L'invention concerne également une composition  
15 destinée à la mise en oeuvre d'un traitement antitumoral ou antiviral, ou toute applications nécessitant la mort cellulaire, chez un mammifère comprenant :

- (i) tout ou partie du polypeptide p53,
- (ii) tout ou partie d'un polypeptide ayant au  
20 moins une activité cytotoxique,

lesdits polypeptides étant définis comme indiqué précédemment.

Un autre objet selon l'invention consiste en une formulation destinée à la mise en oeuvre d'un traitement  
25 antitumoral ou antiviral chez un mammifère caractérisée en ce qu'elle comporte une composition (à base d'acide nucléique ou de polypeptide telle que décrite précédemment), un vecteur adénoviral ou une particule virale selon l'invention, ainsi qu'un support acceptable  
30 d'un point de vue pharmaceutique. Un tel support est préférentiellement isotonique, hypotonique ou faiblement hypertonique et présente une force ionique relativement faible, tel que par exemple une solution de sucre. Par ailleurs, un tel support peut renfermer tout solvant, ou  
35 liquide aqueux ou partiellement aqueux tel que de l'eau stérile non pyrogène. Le pH de la formulation est en outre

ajusté et tamponné afin de répondre aux exigences d'utilisation *in vivo*. La formulation peut également inclure un diluant, un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique, de même que des agents de solubilisation, de stabilisation, de préservation. Pour une administration injectable, on préfère une formulation en solution aqueuse, non-aqueuse ou isotonique. Elle peut être présentée en dose unique ou en multidose sous forme liquide ou sèche (poudre, lyophilisat...) susceptible d'être reconstituée de manière extemporanée par un diluant approprié.

Selon un mode particulier de l'invention, ladite formulation comporte en outre des quantités acceptables d'un point de vue pharmaceutique d'une prodrogue capable d'être transformée en molécule cytotoxique par un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique.

Une telle prodrogue sera notamment sélectionnée dans le groupe consistant en l'acyclovir ou le ganciclovir (GCV), la cyclophosphamide, la 6-méthylpurine deoxyribonucleoside, la 6-thioxanthine, la cytosine ou un de ses dérivés ou l'uracile ou un de ses dérivés. De manière tout à fait préférée, ladite prodrogue est la 5-fluorocytosine (5FC) ou la 5-fluorouracile (5-FU).

Par ailleurs, notamment dans le cadre de formulations renfermant une composition selon la seconde variante évoquée ci-dessus, il convient de noter que ladite formulation peut également comprendre une ou plusieurs substances potentialisant l'effet cytotoxique du 5-FU. On peut citer en particulier, les drogues inhibant les enzymes de la voie de biosynthèse de novo des pyrimidines (par exemple celles citées ci-après), les drogues telles que la Leucovorin (Waxman et al., 1982, Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 18, 685-692) qui en présence du produit du métabolisme du 5-FU (5-FdUMP) augmente l'inhibition de la thymidylate synthase ce qui entraîne une diminution du pool de dTMP nécessaire à la réplication

et enfin les drogues telles que le méthotrexate (Cadman et al., 1979, Science 250, 1135-1137) qui en inhibant la dihydrofolate réductase et en élevant le pool d'incorporation de PRPP (phosphoribosylpyrophosphate) 5 provoque l'augmentation de 5-FU dans l'ARN cellulaire.

Une formulation selon l'invention est plus particulièrement destinée au traitement préventif ou curatif de maladies par thérapie génique et s'adresse plus particulièrement aux maladies prolifératives (cancers, 10 tumeurs, resténose...etc) et aux maladies d'origine infectieuse, notamment virale pour lesquelles il est nécessaire de limiter la prolifération des cellules infectées (induites par les virus de l'hépatite B ou C, le HIV, l'herpès, les rétrovirus....etc.).

15 Une formulation selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle en vue d'une administration par voie locale, parentérale ou digestive. Les voies d'administration envisageables sont multiples. On peut citer par exemple la voie intragastrique, sous- 20 cutanée, intracardiaque, intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, intratumorale, intranasale, intrapulmonaire ou intratrachéale. Pour ces trois derniers modes de réalisation, une administration par aérosol ou instillation est avantageuse. L'administration peut avoir 25 lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage appropriés varient en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu, de la maladie à traiter ou encore du ou des gène(s) d'intérêt à 30 transférer. Les préparations à base de particules virales selon l'invention peuvent être formulées sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  ufp (unités formant des plages), avantageusement  $10^5$  et  $10^{13}$  ufp et, de préférence,  $10^6$  et  $10^{12}$  ufp. Pour ce qui est du vecteur recombinant 35 selon l'invention, des doses comprenant de 0,01 à 100 mg d'ADN, de préférence 0,05 à 10 mg et, de manière tout à

fait préférée, 0,5 à 5 mg peuvent être envisagées. Une composition à base de polypeptides comprend de préférence de 0,05 à 10 g et, de manière tout à fait préférée, de 0,5 à 5 g dudit polypeptide. Bien entendu, les doses peuvent  
5 être adaptées par le clinicien.

La présente invention est également relative à l'utilisation thérapeutique ou prophylactique d'une composition, d'un vecteur recombinant ou d'une particule virale selon l'invention pour la préparation d'un  
10 médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique, notamment pour la préparation d'un médicament antitumoral ou antiviral destiné à inhiber la croissance ou provoquer le rejet d'une tumeur ou la mort d'une cellule infectée. Selon une première possibilité, le  
15 médicament peut être administré directement *in vivo* (par exemple par injection intraveineuse, dans une tumeur accessible ou à sa périphérie, dans les poumons par aérosol, dans le système vasculaire au moyen d'une sonde appropriée...). On peut également adopter l'approche *ex*  
20 *vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moelle osseuse, lymphocytes du sang périphérique, cellules musculaires...), de les transfecter ou infecter *in vitro* selon les techniques de l'art et de les réadministrer au patient. Une utilisation  
25 préférée consiste à traiter ou prévenir les cancers, tumeurs et maladies résultant d'une prolifération cellulaire non désirée. Parmi les applications envisageables, on peut citer les cancers du sein, de l'utérus (notamment ceux induits par les papillomas  
30 virus), de la prostate, du poumon, de la vessie, du foie, du colon, du pancréas, de l'estomac, de l'oesophage, du larynx du système nerveux central et du sang (lymphomes, leucémie etc...). Elle est également utile dans le cadre des maladies cardiovasculaires, par exemple pour inhiber  
35 ou retarder la prolifération des cellules de muscles lisses de la paroi vasculaire (resténose). Enfin pour ce

qui est des maladies infectieuses, l'application au SIDA peut être envisagée.

Il est par ailleurs envisageable, le cas échéant et sans sortir du cadre de la présente invention, de  
5 procéder à des administrations simultanées ou successives par des voies différentes des différents composants compris dans la composition ou la formulation pharmaceutique selon l'invention.

L'invention s'étend également à une méthode pour  
10 le traitement des maladies par thérapie génique, caractérisé en ce que l'on administre à un organisme ou à une cellule hôte ayant besoin d'un tel traitement une séquence nucléotidique, un vecteur recombinant, une particule virale ou une cellule hôte selon l'invention.

15 Lorsque la méthode de traitement met en oeuvre une séquence nucléotidique, un vecteur recombinant ou une particule virale permettant l'expression d'un polypeptide selon l'invention ayant une activité UPRTase, il peut être avantageux d'administrer en outre une seconde séquence  
20 nucléotidique codant pour un second polypeptide présentant une activité CDase, ladite seconde séquence nucléotidique étant portée par ledit vecteur recombinant ou particule virale ou par un vecteur ou une particule virale indépendante. Dans ce dernier cas, l'administration des  
25 séquences UPRTase et CDase peut être simultanée ou consécutive, l'ordre d'administration étant sans importance.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'utilisation thérapeutique ou la méthode de traitement  
30 comprend également une étape supplémentaire selon laquelle on administre à l'organisme ou la cellule hôte des quantités acceptables d'un point de vue pharmaceutique d'une prédrogue, avantageusement d'un analogue de cytosine et, en particulier de la 5-FC. A titre illustratif, une  
35 dose de 50 à 500 mg/kg/jour peut être employée avec une préférence pour 200 mg/kg/jour. Dans le cadre de la

présente invention, la prédrogue est administrée selon les pratiques standards et ceci de manière préalable, concomittante ou encore postérieure à celle de l'agent thérapeutique selon l'invention. La voie orale est  
5 préférée. On peut administrer une dose unique de prédrogue ou des doses répétées pendant un temps suffisamment long pour permettre la production du métabolite toxique au sein de l'organisme ou de la cellule hôte.

Selon un mode avantageux de l'invention,  
10 l'utilisation thérapeutique ou la méthode de traitement est associée à un second traitement du patient par chirurgie (notamment par ablation de la tumeur partiellement ou totalement), par radiothérapie ou chimiothérapie. Dans ce cas particulier, le traitement  
15 selon l'invention est appliqué de manière préalable, concomitante ou fait suite audit second traitement. De manière préférée, ce traitement sera appliqué suite audit second traitement.

Les exemples qui suivent ont pour but d'illustrer les  
20 différents objets de la présente invention et n'ont par conséquent aucun caractère limitatif.

La figure 1 montre l'effet antiprolifératif *in vitro* d'un tampon (Mock), d'un adénovirus vide (Ad-null), d'un adénovirus exprimant FCU1 (Ad-FCU1) ou p53 (Ad-p53) ou p53  
25 et FCU1 (Ad-p53FCU1) sur les cellules SW480 à une MOI de 1 en absence de prodrogue (100% correspond à la viabilité des cellules non infectées).

La figure 2 montre l'effet antiprolifératif *in vitro* de Mock, d'un adénovirus vide, d'un adénovirus  
30 exprimant FCU1 ou p53 ou p53 et FCU1 sur les cellules B16F0 à une MOI de 100 en absence de prodrogue (100% correspond à la viabilité des cellules non infectées).

La figure 3 montre l'effet antiprolifératif *in vitro* de Mock, d'un adénovirus vide, d'un adénovirus exprimant  
35 FCU1 ou p53 ou p53 et FCU1 sur les cellules LoVo à une MOI

de 1 en absence de prodrogue (100% correspond à la viabilité des cellules non infectées).

La figure 4 montre la sensibilisation en présence de différentes concentrations de 5FU des cellules SW480 infectées par Mock, un adénovirus vide, un adénovirus exprimant FCU1 ou p53 ou p53 et FCU1 (100% correspond à la viabilité des cellules infectées en absence de prodrogue).

La figure 5 montre la sensibilisation en présence de différentes concentrations de 5FU des cellules B16F0 infectées par Mock, un adénovirus vide, un adénovirus exprimant FCU1 ou p53 ou p53 et FCU1 (100% correspond à la viabilité des cellules infectées en absence de prodrogue).

La figure 6 montre la sensibilisation en présence de différentes concentrations de 5FU des cellules LoVo infectées par Mock, un adénovirus vide, un adénovirus exprimant FCU1 ou p53 ou p53 et FCU1 (100% correspond à la viabilité des cellules infectées en absence de prodrogue).

La figure 7 montre la sensibilisation en présence de différentes concentrations de 5FC des cellules SW40 infectées par Mock, un adénovirus vide, un adénovirus exprimant FCU1 ou p53 ou p53 et FCU1 (100% correspond à la viabilité des cellules infectées en absence de prodrogue).

La figure 8 montre la sensibilisation en présence de différentes concentrations de 5FC des cellules B16F0 infectées par Mock, un adénovirus vide, un adénovirus exprimant FCU1 ou p53 ou p53 et FCU1 (100% correspond à la viabilité des cellules infectées en absence de prodrogue).

La figure 9 montre la sensibilisation en présence de différentes concentrations de 5FC des cellules LoVo infectées par Mock, un adénovirus vide, un adénovirus exprimant FCU1 ou p53 ou p53 et FCU1 (100% correspond à la viabilité des cellules infectées en absence de prodrogue).

La figure 10 représente le taux de survie de souris B6D2 dans lesquelles ont été implantées des cellules tumorales B16F0 traitées par différentes compositions adénovirales.

La figure 11 montre la sensibilisation en présence de différentes concentrations de 5FC des cellules SK-BR-3 (ATCC HTB-22) infectées par Mock, un adénovirus vide, un adénovirus exprimant FCU1 ou p53 ou p53 et FCU1 (100% correspond à la viabilité des cellules infectées en absence de prodroque).

La figure 12 montre la sensibilisation en présence de différentes concentrations de 5FC des cellules T47-D (ATCC HTB-133) infectées par Mock, un adénovirus vide, un adénovirus exprimant FCU1 ou p53 ou p53 et FCU1 (100% correspond à la viabilité des cellules infectées en absence de prodroque).

La figure 13 montre la sensibilisation en présence de différentes concentrations de 5FC des cellules WiDr (ATCC CCL-218) infectées par Mock, un adénovirus vide, un adénovirus exprimant FCU1 ou p53 ou p53 et FCU1 (100% correspond à la viabilité des cellules infectées en absence de prodroque).

#### 20           **EXEMPLES :**

La présente invention est illustrée, sans pour autant être limitée, par les exemples suivants.

Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans 25 Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Les étapes de recombinaison homologue sont de 30 préférence réalisées dans la souche *E. coli* BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580). S'agissant de la réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN 35 polymérase I d'*E. coli* (Klenow). Par ailleurs, les fragments de génome adénoviral employés dans les



différentes constructions décrites ci-après, sont indiqués précisément selon leur position dans la séquence nucléotidique du génome de l'Ad5 telle que divulguée dans la banque de données Genebank sous la référence M73260.

5           En ce qui concerne la biologie cellulaire, les cellules sont transfectées ou transduites et cultivées selon les techniques standards bien connues de l'homme du métier.

10           **EXEMPLE 1 : Construction d'un adénovirus exprimant p 53 (Adp53).**

La région codante de p53 a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pC53-SN3 (Baker et al., 1990, Science 249, 912-915) utilisé comme matrice et des amorces

15           suivantes :

En 5' terminal :

5'ggcagccagaattccttccgggtcac<sup>3</sup>' (SEQ ID NO :3)

En 3' terminal :

5'ggctgtcagtggggatctagaagtggag<sup>3</sup>' (SEQ ID NO :4)

20

Les sites *EcoRI* et *XbaI* ont été introduits respectivement en 5' et en 3' de la séquence codante de p53. le fragment PCR de p53 a été coupé par *EcoRI* et *XbaI* puis inséré dans le plasmide pCI-neo (Promega Corp) pour  
25           donner le plasmide pCI-neop53. Le fragment *XhoI-XbaI* de pCI-neop53 renfermant le gène p53 est isolé et introduit dans le vecteur pTG6600 (Lathe et al, 1987, Gene 57, 193-201) clivé par ces mêmes enzymes, pour donner le vecteur de transfert pTG6600p53. Le vecteur adénoviral Adp53 est  
30           reconstitué par recombinaison homologue dans la souche *E.coli* BJ5183 entre le fragment *PacI-BstEII* de pTG6600p53 et le vecteur pTG6624 linéarisé par *ClaI*. La construction finale Adp53 contient le génome de l'Ad5 délété de  
35           l'essentiel des régions E1 (nucléotides 459 à 3328) et E3 (nucléotides 28249 à 30758) et en lieu et place de E1, une cassette d'expression du gène p53 placé sous le contrôle

du promoteur précoce CMV et des séquences d'épissage hybrides  $\beta$ -globine/Ig. Les particules virales sont générées par transfection dans une lignée de cellules 293 (ATCC CRL1573) qui complètent la fonction E1.

5

**EXEMPLE 2 : Construction d'un adénovirus exprimant une unité bicistronique p53-IRES-FCU1 (Adp53FCU1).**

Le fragment *NcoI-SalI* du plasmide pCI-neoFCU1 décrit dans la demande de brevet française No. 98.05054  
10 renfermant le gène de fusion FCU1 est isolé et introduit dans le vecteur pTG4369 linéarisé par *NcoI-SalI*. Le plasmide pTG4369FCU1 ainsi obtenu contient le gène FCU1 en aval de la séquence IRES (pour Internal Ribosome Entry Site ou site interne d'entrée des ribosomes) de EMCV  
15 (encephalomyocarditis virus). Le fragment *SacI-NotI* de pCI-neop53 est isolé puis inséré dans le vecteur pTG4369FCU1 linéarisé par *SacI-NotI* pour donner le vecteur pTG4369p53FCU1 dans lequel le gène p53 est placé en amont de la séquence IRES. Le fragment *NheI-MluI* de  
20 pTG4369p53FCU1 renfermant la séquence p53IRESFCU1 est inséré dans le vecteur pTG6600 clivé par ces mêmes enzymes pour donner le vecteur de transfert pTG6600p53IRESFCU1. Le vecteur adénoviral Adp53FCU1 est reconstitué par recombinaison homologue dans la souche *E.coli* BJ5183 entre  
25 le fragment *PacI-BstEII* de pTG6600p53IRESFCU1 et le vecteur pTG6624 linéarisé par *ClaI*. La construction finale Adp53FCU1 contient le génome de l'Ad5 délété de l'essentiel des régions E1 (nucléotides 459 à 3328) et E3 (nucléotides 28249 à 30758) et en lieu et place de E1, une  
30 cassette d'expression du bicistron p53-FCU1 placé sous le contrôle du promoteur précoce CMV et des séquences d'épissage hybrides  $\beta$ -globine/Ig. Les particules adénovirales sont générées par transfection dans une lignée de cellules 293 (ATCC CRL1573) qui complètent la  
35 fonction E1.

**EXEMPLE 3 : Construction de l'adénovirus exprimant le gène de fusion FCU1 (AdFCU1).**

Le fragment *XhoI-MluI* de pCI-neoFCU1 (décrit dans la demande de brevet français No. 98.05054) renfermant le gène de fusion FCU1 est isolé et introduit dans le vecteur pTG6600 linéarisé par *XhoI-MhuI* pour donner le vecteur de transfert pTG6600FCU1. Comme décrit précédemment, la recombinaison homologue entre le fragment *PacI-BstEII* portant FCU1 et isolé de pTG6600FCU1 et le vecteur pTG6624 linéarisé par *ClaI* permet de générer le vecteur adénoviral pTG6624FCU1 délété des régions E1 et E3 et comportant à la place de E1 le gène FCU1 placé sous le contrôle du promoteur CMV et des séquences d'épissage hybrides  $\beta$ -globine/Ig. Les particules adénovirales sont générées par transfection dans une lignée de cellules 293 (ATCC CRL1573) qui complètent la fonction E1.

**EXEMPLE 4 : Infection par les adénovirus AdFCU1, Adp53 et Adp53FCU1.**

**4.1 Résultats *in vitro*.**

Les constructions adénovirales des exemples précédents sont utilisées pour infecter *in vitro* 3 lignées cellulaires tumorales :

- la lignée tumorale humaine SW480 (adénocarcinome de colon/ATCC CCL-228) dont le gène p53 n'est pas fonctionnel,
- la lignée cellulaire tumorale humaine LoVo (adénocarcinome de colon / ATCC CCL-229) dont le gène p53 est fonctionnel et
- la lignée mélanome de souris B16(F0) (ATCC CRL-6322)

Les cellules sont infectées (MOI de 1 pour SW480 et LoVo et MOI de 100 pour B16(F0)) puis cultivées en présence ou en absence de prodrogue (5-fluorocytosine (5FC) ou 5-fluorouracile (5FU)) à différentes concentrations. Après trypsinisation (à J+10 pour SW480 et

à J+8 pour B16(F0)), la viabilité des cellules est évaluée au bleu trypan. Les valeurs reportées correspondent aux moyennes obtenues après 4 comptages.

En absence de prodrogue (Figures 1 à 3), on observe un effet antiprolifératif des cellules infectées par un adénovirus exprimant p53 (Adp53 et Adp53FCU1) dans les lignées SW480 principalement et plus faiblement dans les lignées B16F0. Toutefois, malgré l'expression de p53 qui induit l'apoptose ou la suppression de la croissance des cellules, aucun effet antiprolifératif n'est observé dans la lignée LoVo ; cela indique que la seule administration de p53, notamment dans des cellules tumorales dont le gène p53 est fonctionnel, est insuffisante, voire inopérante, pour permettre la mise en oeuvre d'un protocole de thérapie antitumorale efficace.

Au contraire, on constate qu'en présence de différentes concentrations de prodrogue 5FU (Figures 4 à 6), les cellules infectées par Adp53 sont sensibilisées par rapport aux cellules non infectées ou infectées par un adénovirus non recombinant illustrant ainsi l'action connue de p53 dans la toxicité du 5FU. Toutefois, conformément à la présente invention, on constate également que, de manière surprenante, la présence de FCU1 augmente très sensiblement la toxicité du 5FU dans les cellules (100% correspond à la viabilité des cellules infectées en absence de 5FU) traduisant ainsi un effet clairement synergique des deux types d'agent.

Les figures 7 à 9 illustrent les résultats analogues obtenus en utilisant 5FC comme prodrogue.

Ces résultats mettent en évidence qu'il existe une synergie entre les produits d'expression de FCU1 et de p53 pour l'induction de la mortalité lorsque le 5FC ou le 5FU sont utilisés comme prodrogues.

#### 4.2 Résultats *in vivo*.

Des cellules B16F(0) ( $3.10^5$  cellules) sont injectées par voie sous cutanée à 4 groupes de 8 souris

immunocompétentes B6D2 à J0. Dès que les tumeurs deviennent palpables (environ J+9), les constructions adénovirales comprenant le gène p53 (Adp53) ou les gènes p53 et FCU1 (Adp53FCU1) ou une construction adénovirale non recombinante (Ad null) sont injectées à une dose de  $5 \cdot 10^8$  UI à trois jours consécutifs (J+9, J+10 et J+11). A partir de J+9, 1 ml d'une solution saline à 0,9% ou 1 ml d'une solution de 5-FC à 1% sont injectées par voie intrapéritonéale, deux fois par jour. Les résultats présentés à la figure 10 mettent en évidence une augmentation du taux de survie des souris dans lesquelles a été injecté l'Adp53FCU1 et qui ont été traitées au 5-FC.

**EXEMPLE 5 : Infection de cellules exprimant une protéine p53 non fonctionnelle par AdFCU1, Adp53 et Adp53FCU1**

Les cellules cancéreuses présentes chez des patients à traiter expriment généralement une forme non fonctionnelle de p53. Par conséquent, afin de tester les compositions de l'invention dans des conditions comparables avec les situations pathologiques, les constructions adénovirales des exemples précédents ont été utilisés pour infecter in vitro 3 types de lignées cellulaires tumorales :

- La lignée tumorale SK-BR-3 (ATCC HTB-22) dont le gène p53 est muté et code pour une protéine p53 non fonctionnelle (Arg<sub>175</sub>->His<sub>175</sub>) (Kovach et al, 1991, J. Nat. Cancer Inst., 83, 1004-1009)
- La lignée tumorale T47-D (ATCC HTB-133) dont le gène p53 est muté et code pour une protéine p53 non fonctionnelle (Leu<sub>194</sub>->His<sub>194</sub>) (Nigro et al, 1989, Nature, 342, 705-708)
- La lignée tumorale WiDr (ATCC CCL-218) dont le gène p53 est muté et code pour une protéine p53 non fonctionnelle (Arg<sub>273</sub>->His<sub>273</sub>) (Li et al, 1995, Int. J. Cancer, 64, 383-387)

Les cellules sont infectées (MOI de 1) puis cultivées en présence ou en absence de différentes concentrations de prodrogue (5-fluorocytosine (5FC)) selon les conditions décrites dans l'exemple 4. Après  
5 trypsinisation, la viabilité des cellules est évaluée au bleu trypan. Les valeurs reportées sur les figures 11 à 13 correspondent aux moyennes obtenues après 4 comptages.

Pour chacune de ces lignées, un effet antiprolifératif est observé en l'absence de prodrogue  
10 dans les cas où l'infection est réalisée par un adénovirus exprimant le polypeptide p53 (Adp53 et Adp53FCU1).

Les résultats obtenus (Figures 11 à 13) sont comparables à ceux observés dans l'exemple 4. Plus particulièrement, on constate que la co-expression de p53  
15 et de FCU1 dans les cellules cultivées en présence de 5-FC augmente très sensiblement la toxicité de cette prodrogue à l'égard des cellules, confirmant ainsi l'effet synergique de ces deux produits d'expression.

## REVENDICATIONS

1. Composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement antitumoral ou antiviral chez un mammifère  
5 comprenant :

(i) une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie du polypeptide p53,

(ii) au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins  
10 une activité cytotoxique,

lesdites séquences d'acide nucléique étant placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte dudit mammifère.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une  
15 activité antitumorale ou antivirale est choisi parmi les cytokines, les protéines codées par les gènes suicides et les facteurs protéiques anti-angiogéniques.

3. Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une  
20 activité cytotoxique est une cytokine choisie parmi les interférons  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , les interleukines, les facteurs nécrosant des tumeurs et les facteurs stimulateurs de colonies.

4. Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une  
25 activité cytotoxique est l'interleukine-2 (IL-2).

5. Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une  
30 activité cytotoxique est l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ).

6. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit polypeptide présente au moins une activité cytotoxique sélectionnée parmi l'activité thymidine kinase, l'activité purine nucleoside  
35 phosphorylase, l'activité guanine phosphoribosyl transférase et l'activité cytosine désaminase.

7. Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit polypeptide présente au moins une activité CDase et une activité UPRTase.

8. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique (ii) est sélectionnée parmi CodA, upp, FUR1, FCY1 et FUR1Δ105.

9. Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit polypeptide est un polypeptide de fusion dans lequel un premier polypeptide présentant une activité UPRTase ou CDase est fusionné en phase avec au moins un second polypeptide, ledit second polypeptide présentant une activité CDase ou UPRTase, respectivement.

10. Composition selon la revendication 9, caractérisée en ce que la fusion avec le second polypeptide est réalisée à l'extrémité N-terminale dudit premier polypeptide.

11. Composition selon la revendication 9-10, caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique codant pour ledit polypeptide de fusion est une séquence hybride comprenant :

- une première séquence d'acide nucléique codant pour un premier polypeptide présentant une activité UPRTase,
- une seconde séquence d'acide nucléique codant pour un second polypeptide présentant une activité CDase.

12. Composition selon la revendication 11 caractérisée en ce que la première séquence d'acide nucléique est sélectionnée parmi upp, FUR1 et FUR1Δ105, et en ce que la seconde séquence d'acide nucléique est sélectionnée parmi CodA et FCY1.

13. Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une activité cytotoxique est un facteur protéique antiangiogénique choisi parmi l'angiostatine,



l'endostatine, le facteur plaquettaire PF4, la thrombospondine-1, le PRP, le VEGI et l'urokinase.

14. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdites séquences d'acide  
5 nucléique (i) et (ii) sont insérées dans un vecteur recombinant d'origine plasmidique ou virale.

15. Composition selon la revendication 14, caractérisée en ce que lesdites séquences d'acide  
nucléique (i) et (ii) sont insérées dans le même vecteur  
10 recombinant.

16. Composition selon la revendication 14, caractérisée en ce que lesdites séquences d'acide  
nucléique (i) et (ii) sont insérées dans des vecteurs recombinants distincts.

15 17. Vecteur comprenant :  
(i) une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie du polypeptide p53,  
(ii) au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins  
20 une activité cytotoxique,

lesdites séquences d'acide nucléique étant placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte.

18. Vecteur selon la revendication 17,  
25 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur viral.

19. Particule virale comprenant un vecteur selon la revendication 18.

20. Procédé de préparation d'une particule virale selon la revendication 19, selon lequel :

30 (i) on introduit un vecteur viral selon la revendication 18 dans une cellule capable de produire ledit vecteur, de manière à obtenir une cellule transfectée,

(ii) on cultive ladite cellule transfectée dans  
35 des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule virale, et

(iii) on récupère ladite particule virale dans la culture cellulaire.

21. Composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement antitumoral ou antiviral chez un mammifère  
5 comprenant :

(i) tout ou partie du polypeptide p53,

(ii) tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique,

selon laquelle ledit polypeptide ayant au moins  
10 une activité cytotoxique est tel que défini dans les revendications 1 à 13.

22. Formulation destinée à la mise en oeuvre d'un traitement antitumorale ou antiviral chez un mammifère caractérisée en ce qu'elle comporte une  
15 composition selon l'une des revendications 1 à 16, un vecteur selon les revendications 17-18, une particule virale selon la revendication 19, ou une composition selon la revendication 21, ainsi qu'un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

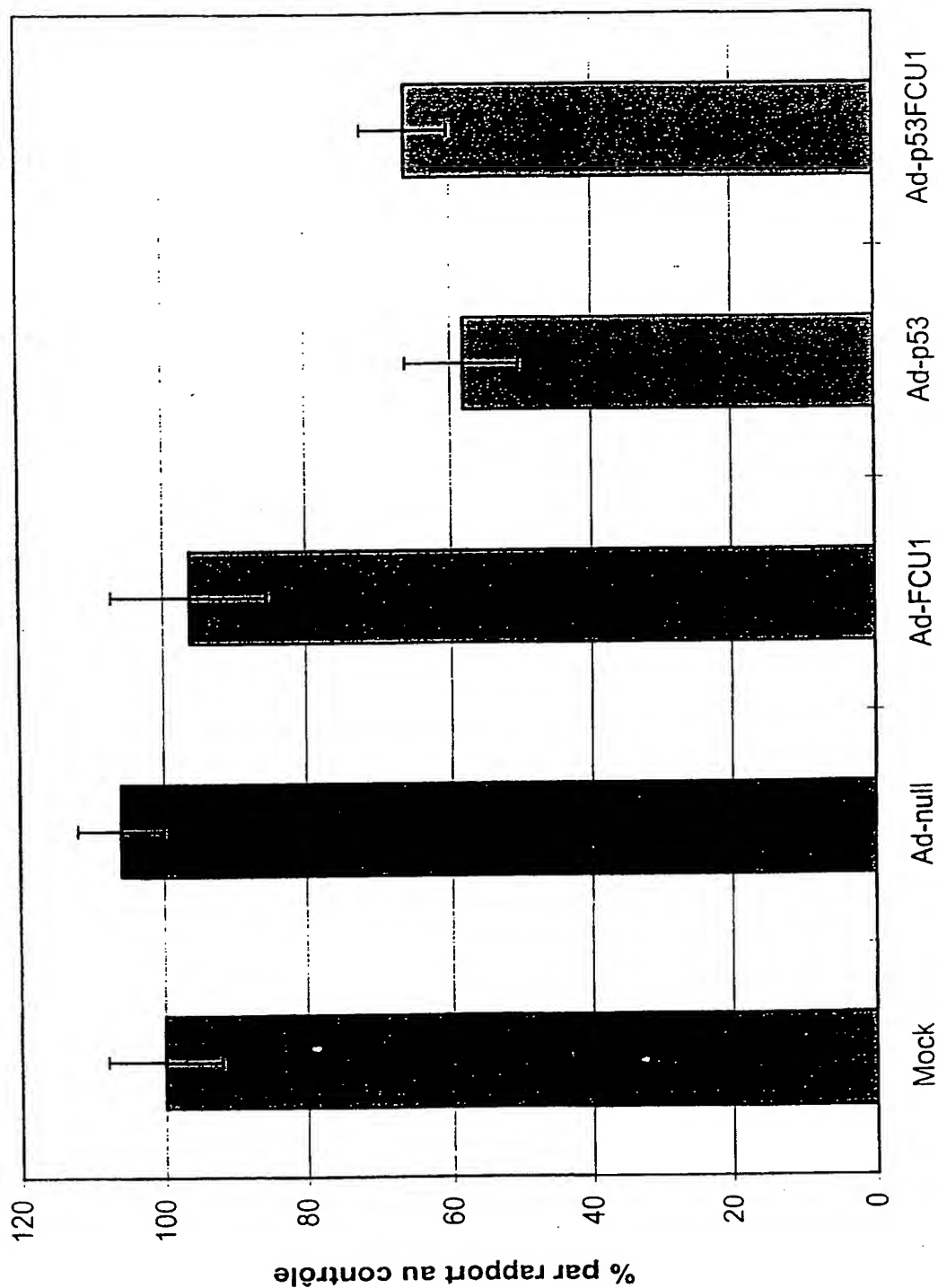
20 23. Formulation selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'elle comporte des quantités acceptables d'un point de vue pharmaceutique d'une prodrogue capable d'être transformée en molécule cytotoxique par un polypeptide ayant au moins une activité  
25 cytotoxique.

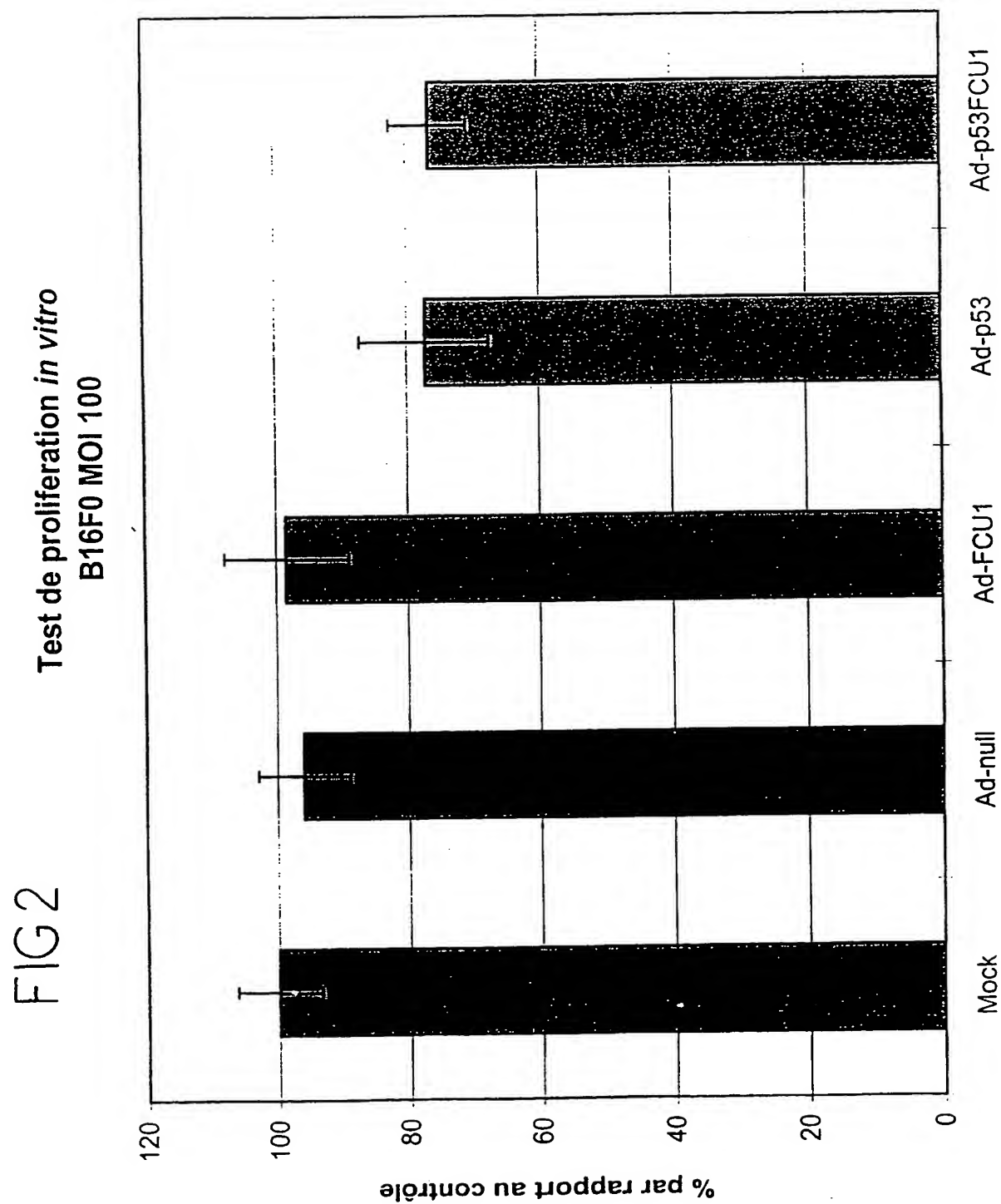
24. Formulation selon la revendication 23, caractérisée en ce que ladite prodrogue est sélectionnée parmi la 5-fluorouracile (5-FU) et la 5-fluorocytosine ((5-FC)).

30 25. Utilisation d'une composition selon les revendications 1 à 16, d'un un vecteur selon les revendications 17-18, d'une particule virale selon la revendication 19, ou d'une composition selon la revendication 21, pour la préparation d'un médicament  
35 antitumoral ou antiviral.

Test de proliferation *in vitro*  
SW480 MOI 1

FIG 1





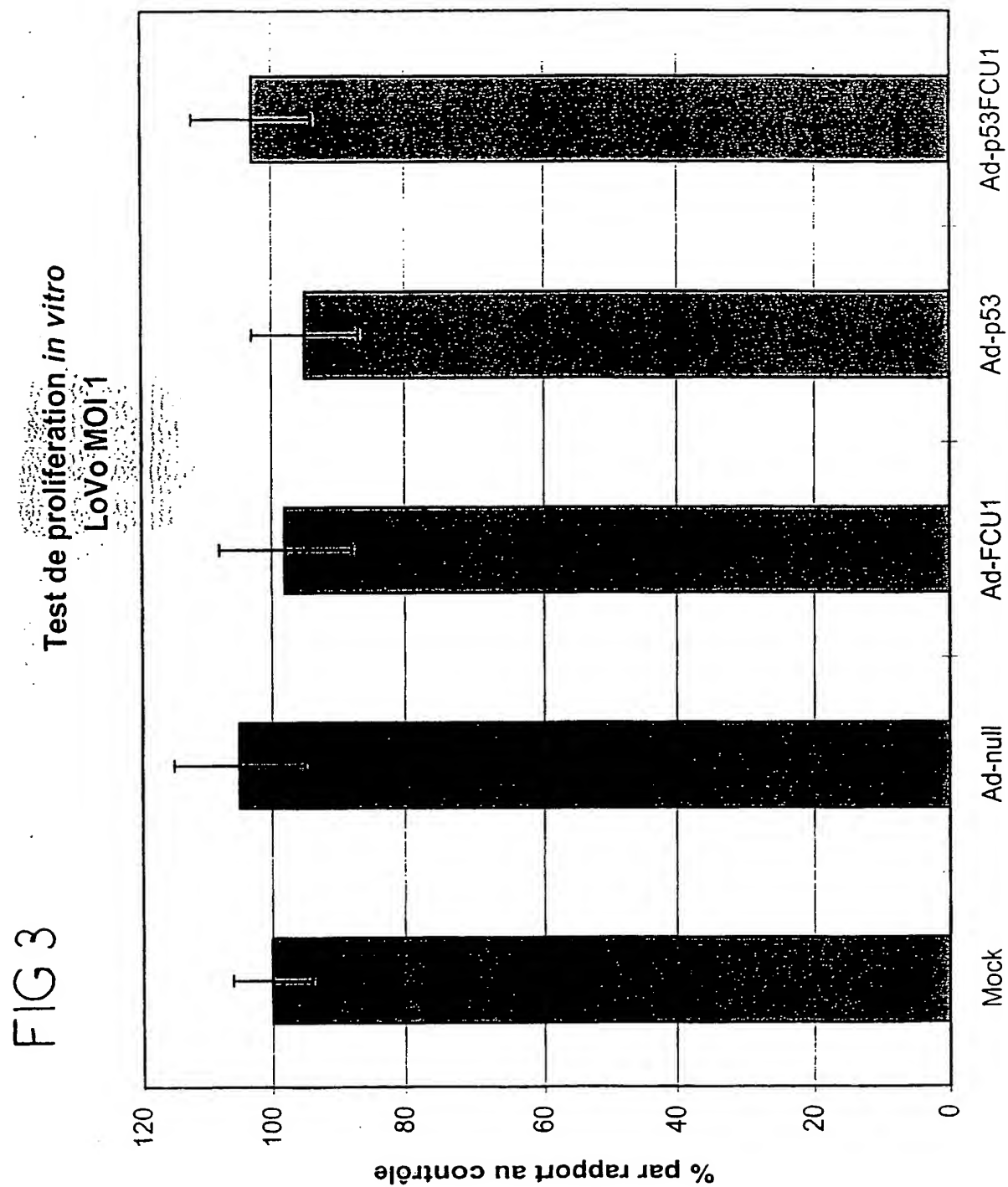
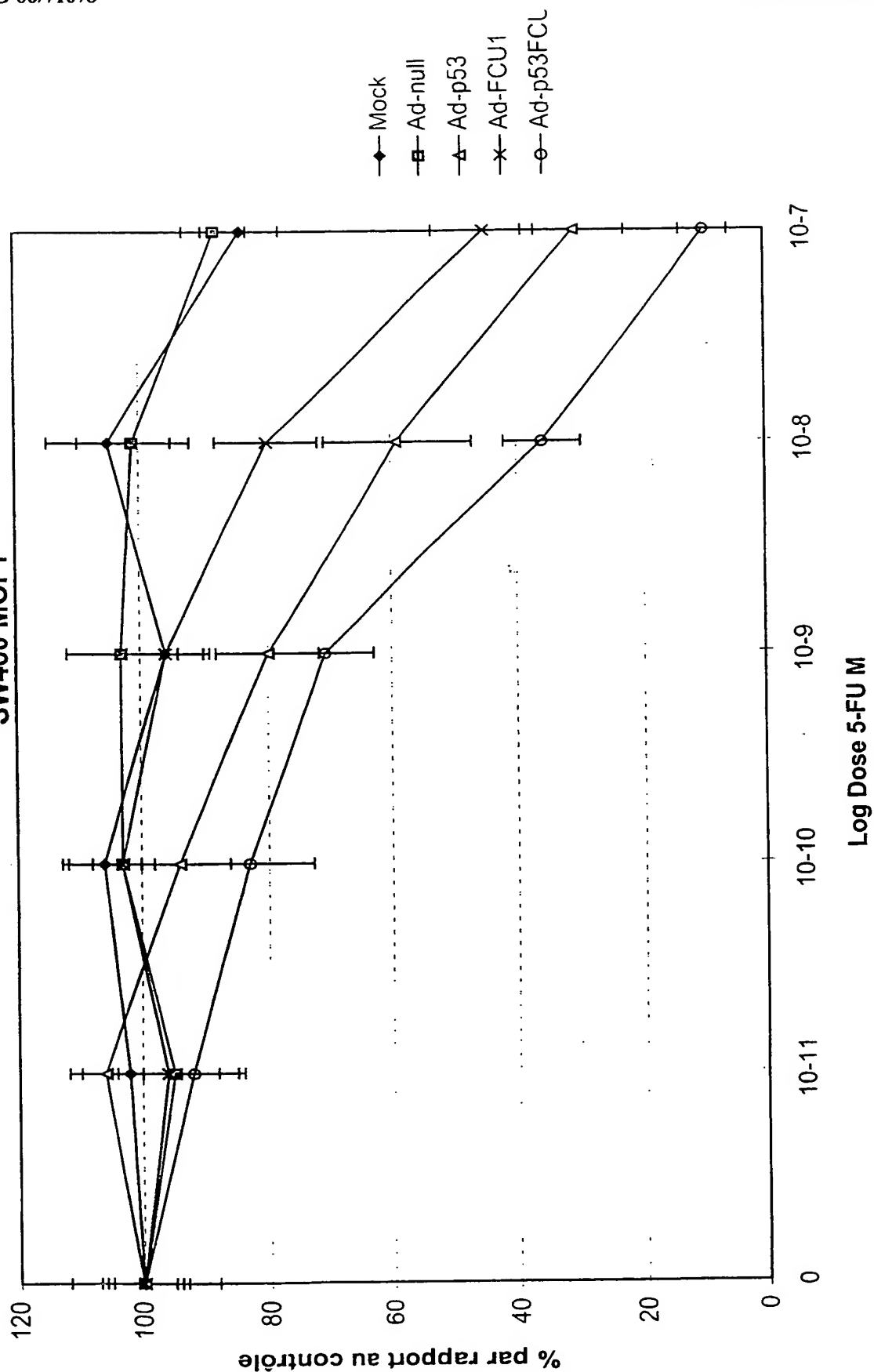
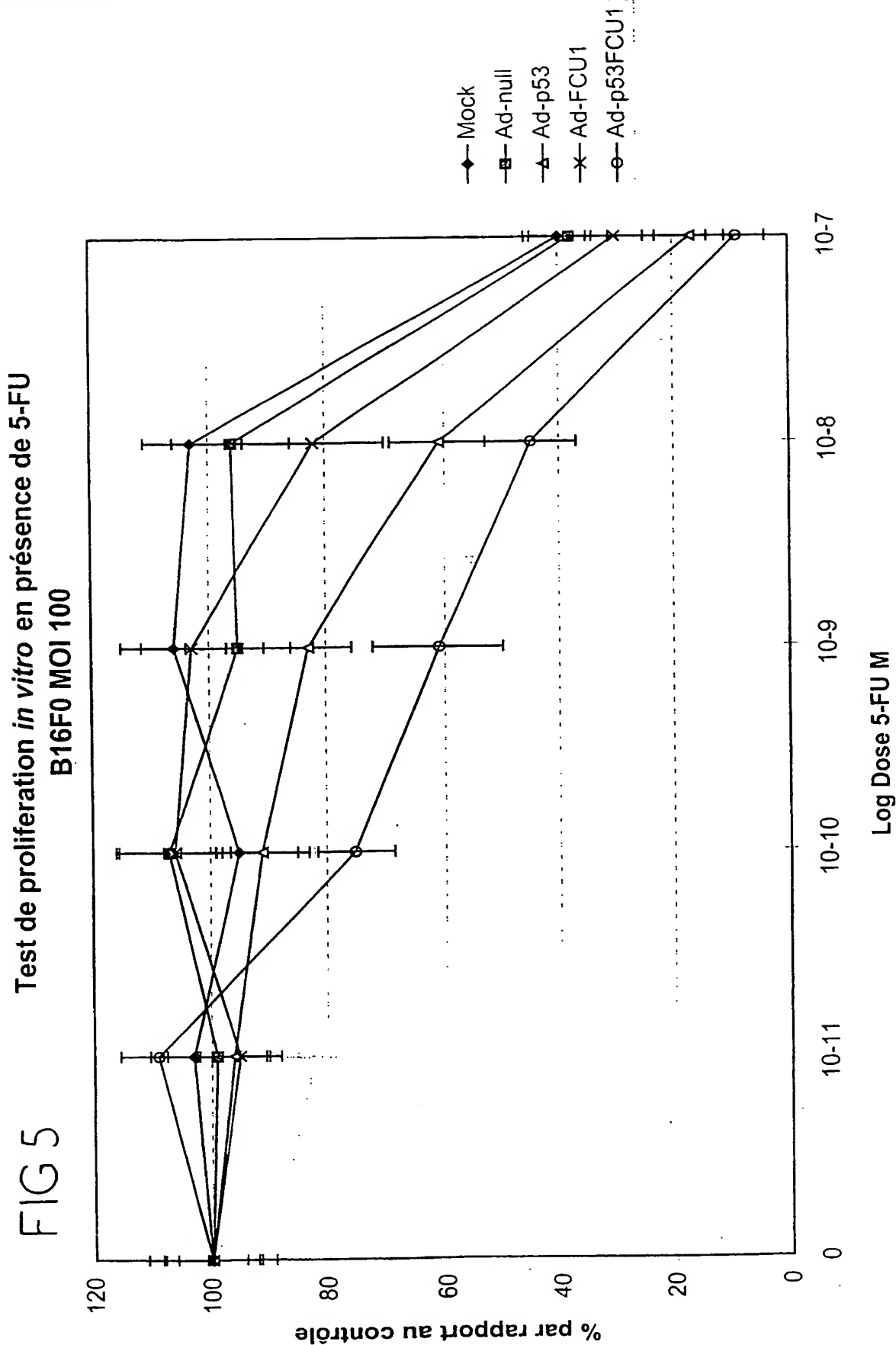


FIG 4

Test de prolifération *in vitro* en présence de 5-FU

SW480 MOI 1





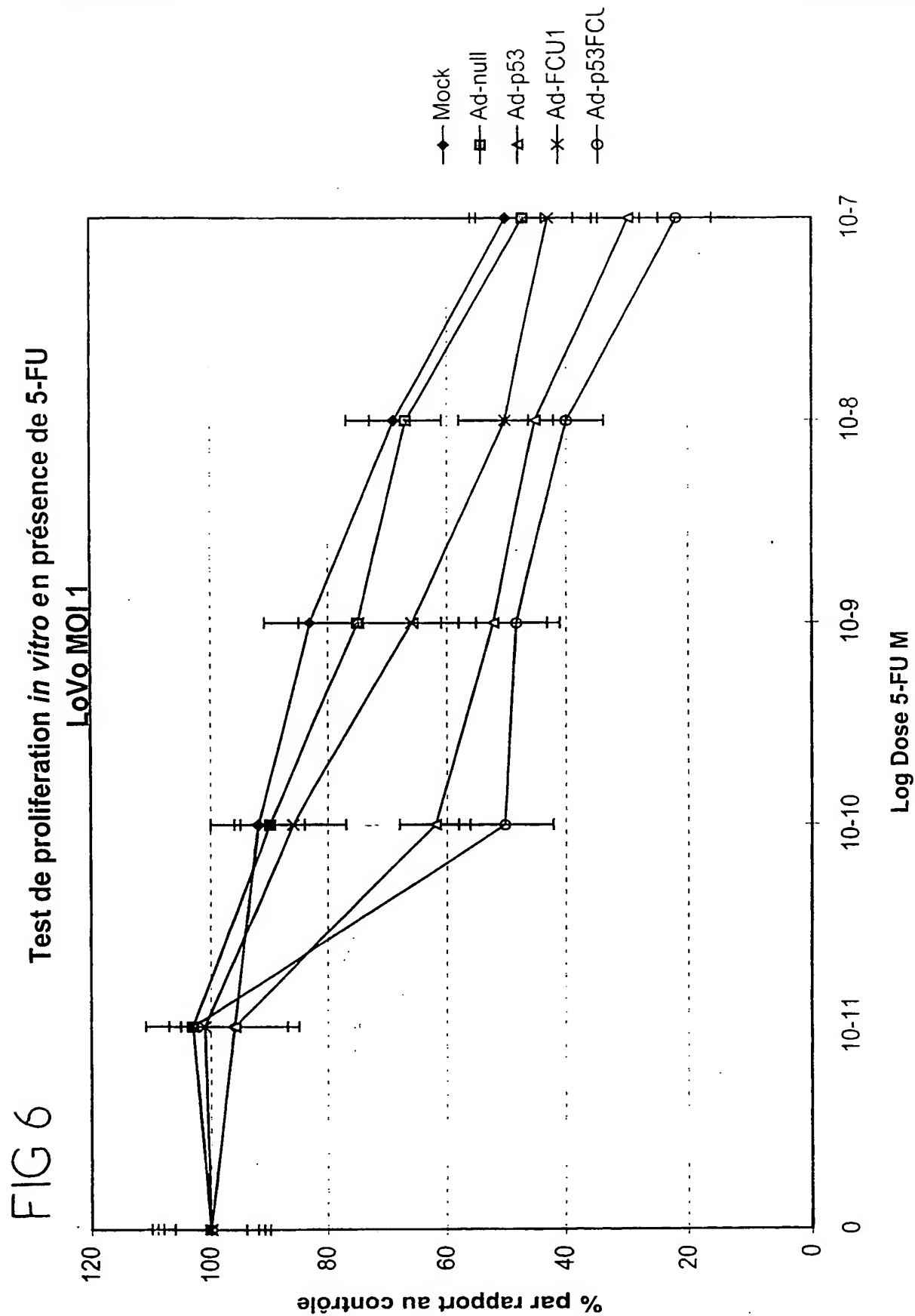




FIG 7  
Test de prolifération *in vitro* en présence de 5-FC  
SW480-MOI 1

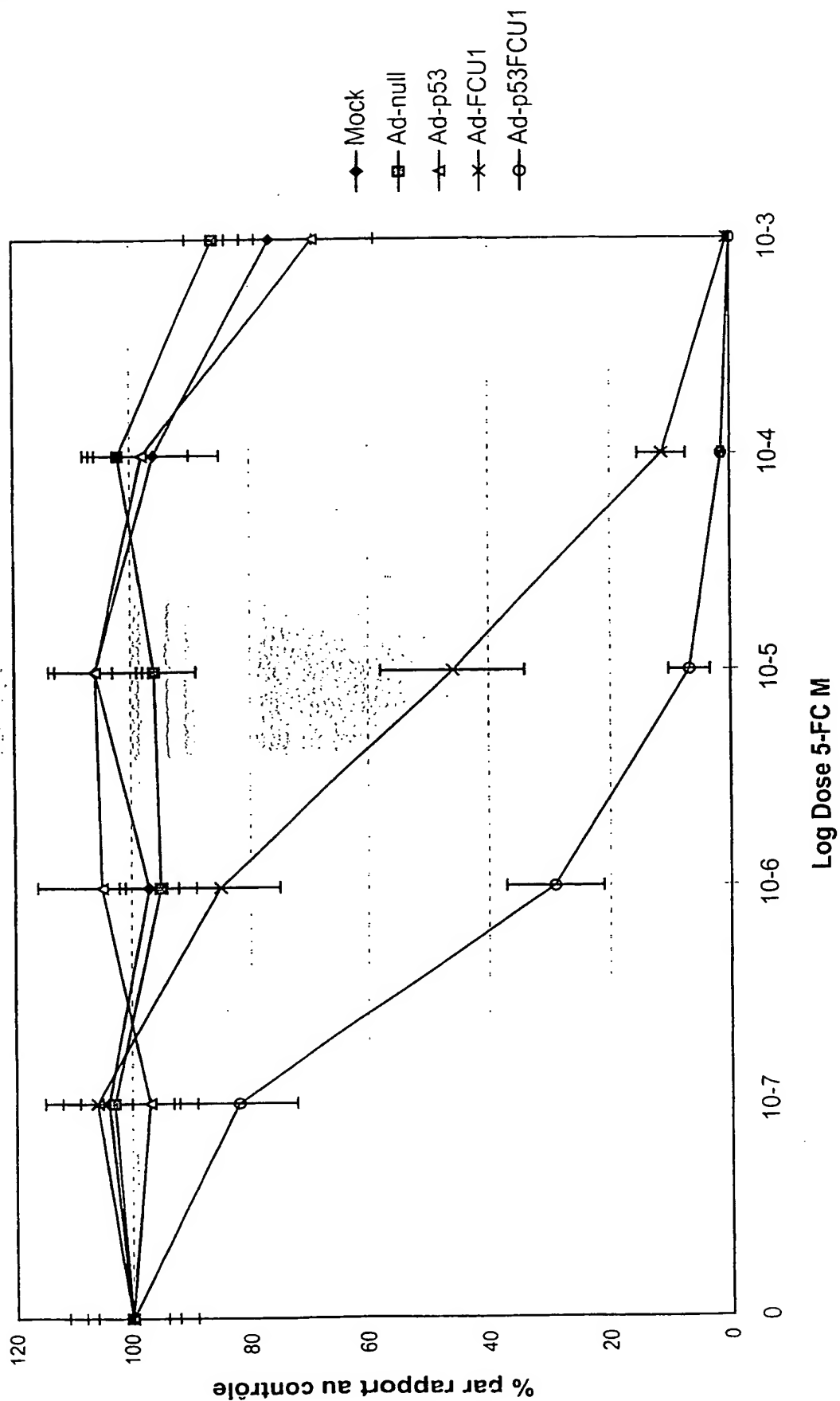


FIG 8  
Test de prolifération *in vitro* en présence de 5-FC  
B16F0 MOI 100

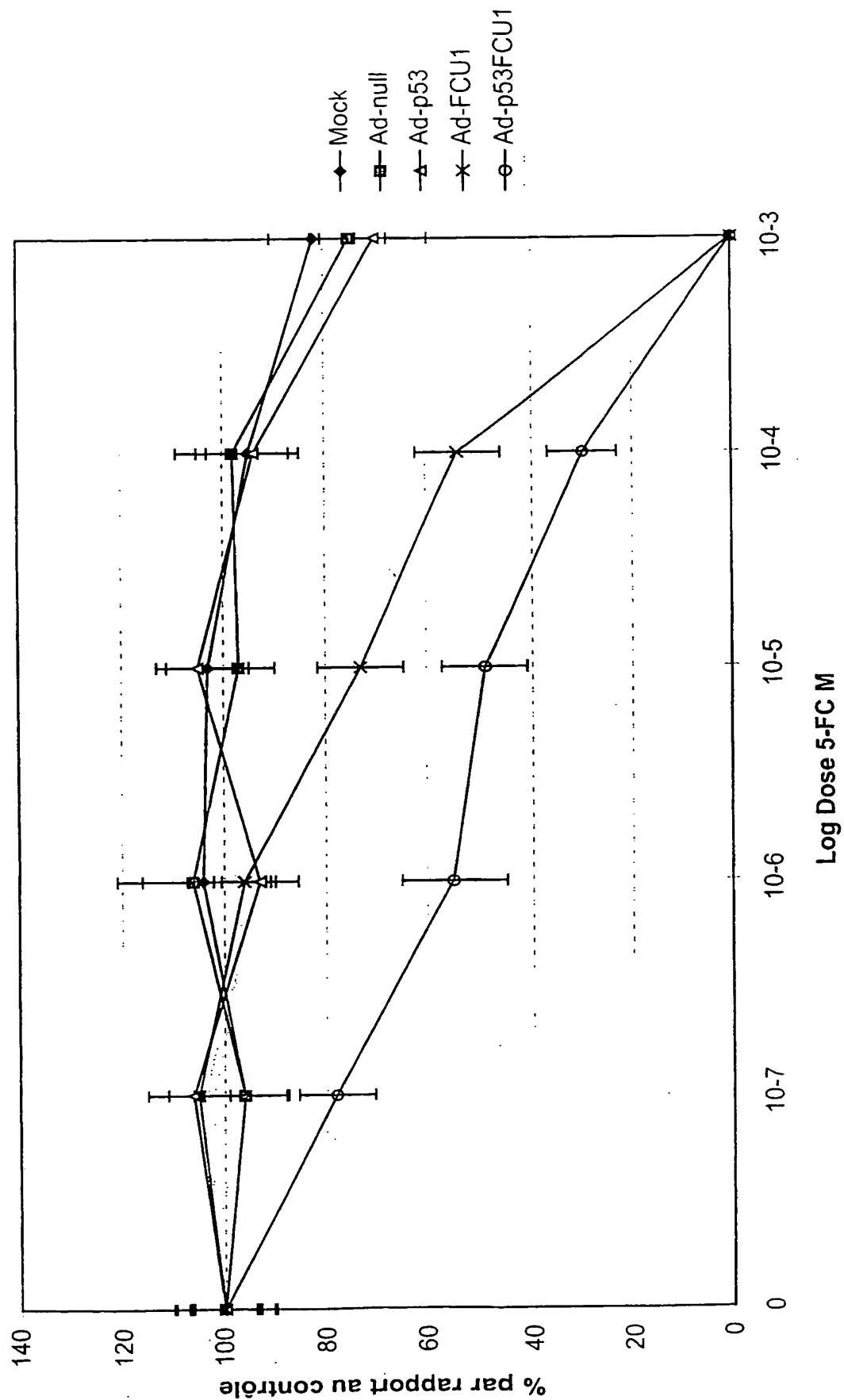


FIG 9

Test de prolifération *in vitro* en présence de 5-FC  
LoVo MOI 1

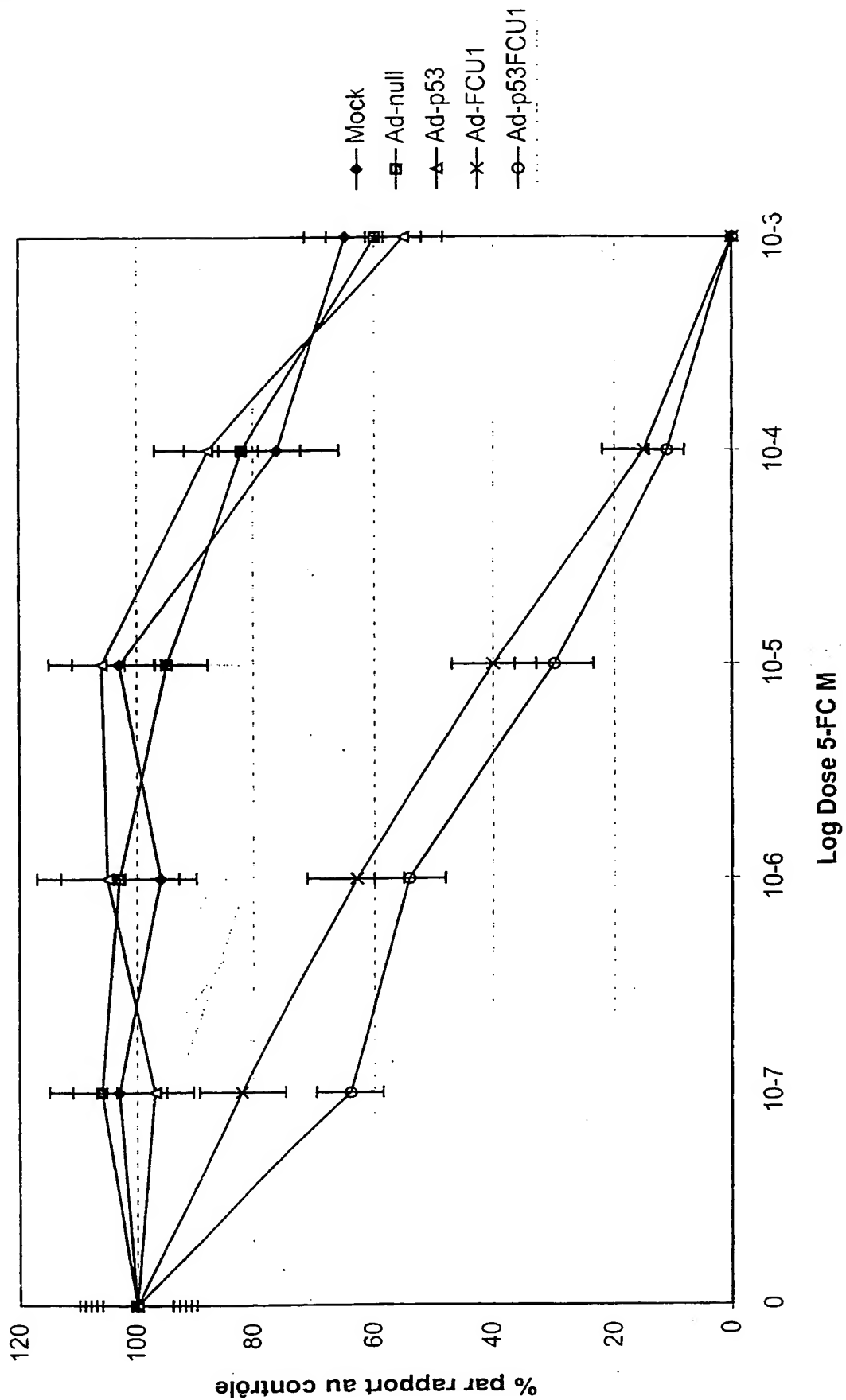
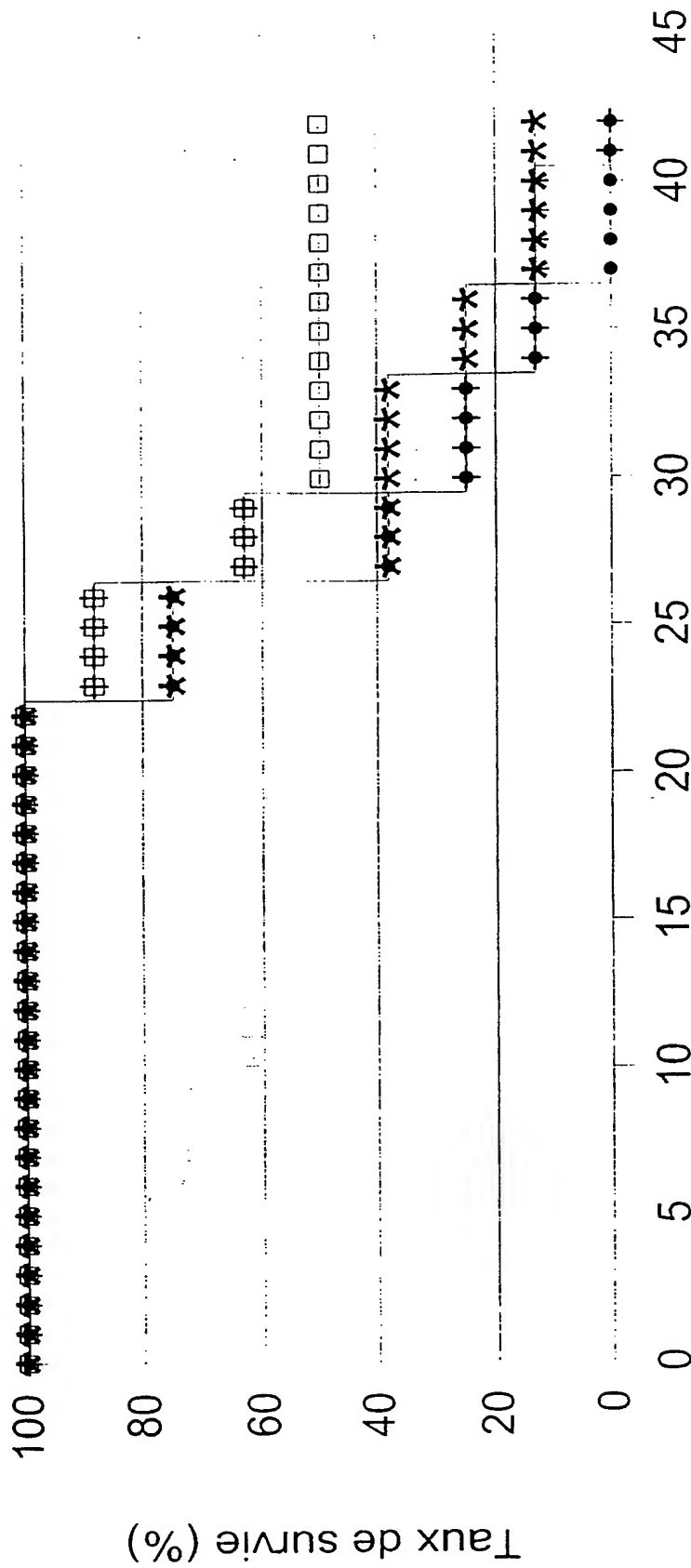


FIG 10



Temps après implantation (jours)

● Adnull/saline (n=8) ⊕ Adp53/saline (n=8) ★ Adp53FCU1/5FC (n=8)

FIG 11  
Test de prolifération *in vitro* en présence de 5-FC  
SK-BR-3 MOI 1

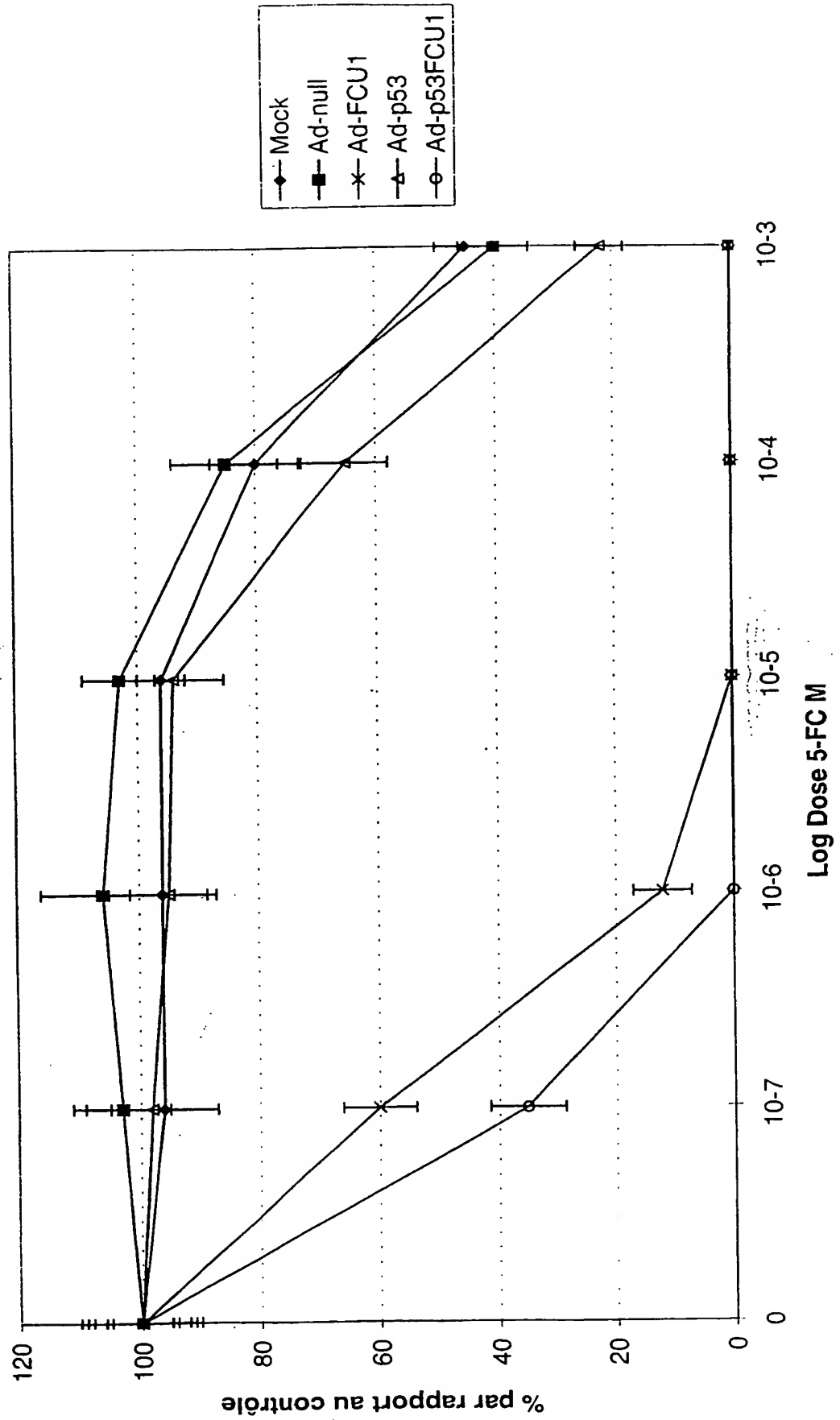


FIG 12  
Test de prolifération *in vitro* en présence de 5-FC  
T47-D MOI 1

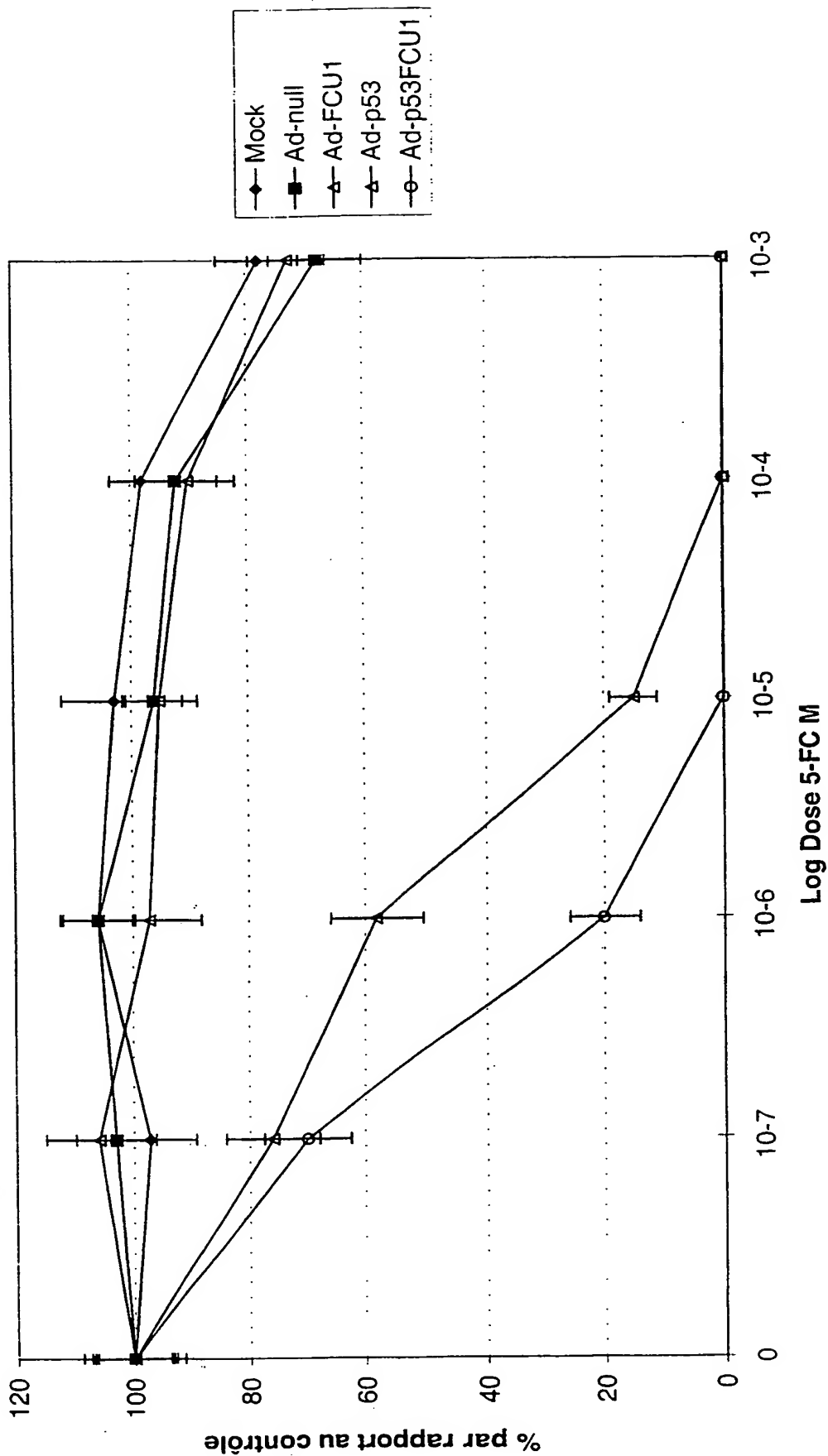
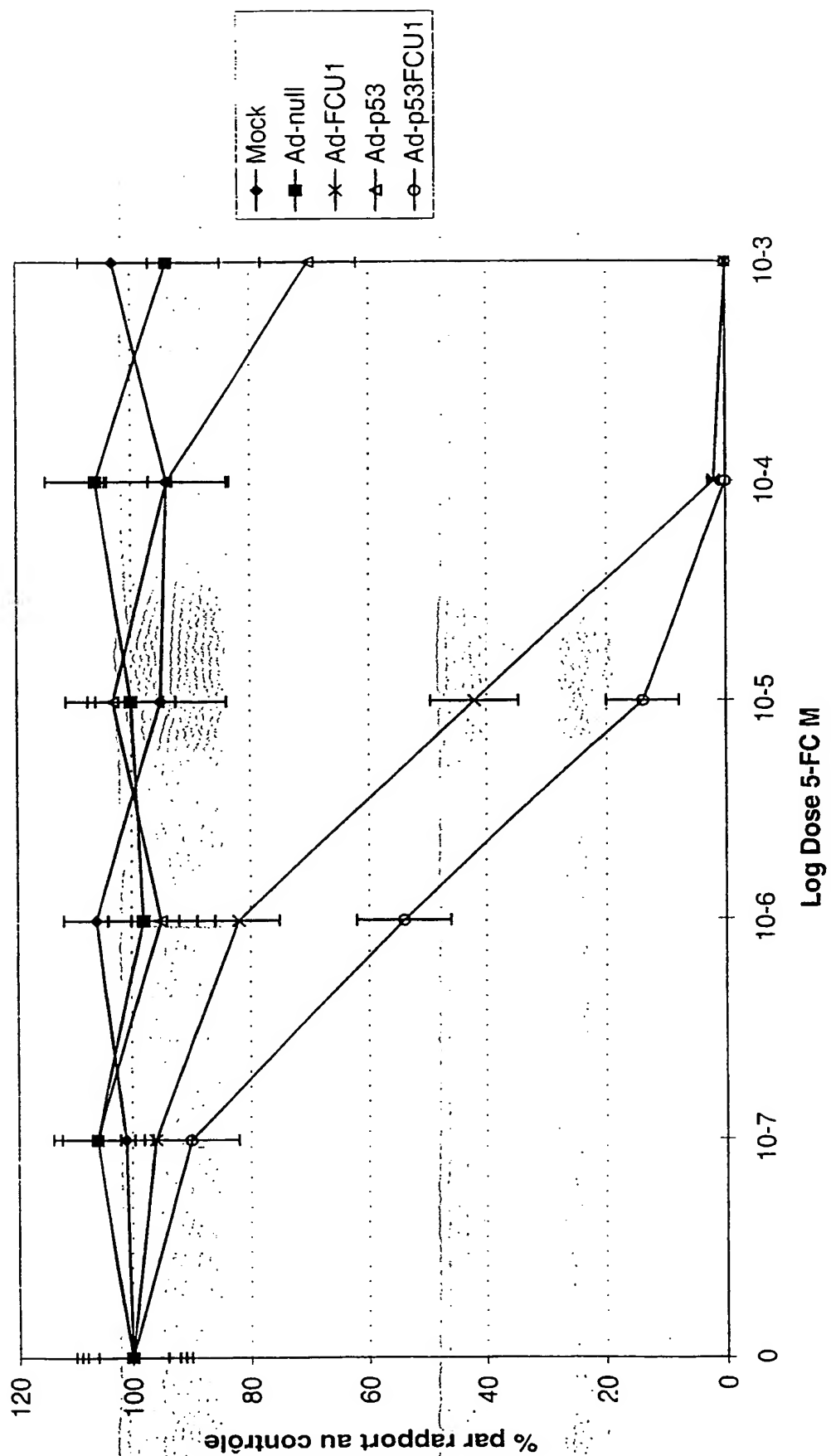


FIG 13  
Test de prolifération *in vivo* en présence de 5-FC  
WiDr MOI 1



## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; TRANSGENE

<120> Composition destinée à la mise en oeuvre d'un  
traitement antitumoral ou antiviral chez un mammifère

&lt;130&gt; Polypeptide p53

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; FR9906892

&lt;151&gt; 1999-05-25

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 216

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Saccharomyces cerevisiae

&lt;400&gt; 1

Met	Ala	Ser	Glu	Pro	Phe	Lys	Asn	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro	Gln	Thr	Asn
1				5					10					15	

Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Tyr	Thr	Ile	Ile	Arg	Asn	Lys	Asn	Thr	Thr	Arg
			20					25					30		

Pro	Asp	Phe	Ile	Phe	Tyr	Ser	Asp	Arg	Ile	Ile	Arg	Leu	Leu	Val	Glu
		35					40					45			

Glu	Gly	Leu	Asn	His	Leu	Pro	Val	Gln	Lys	Gln	Ile	Val	Glu	Thr	Asp
	50					55					60				

Thr	Asn	Glu	Asn	Phe	Glu	Gly	Val	Ser	Phe	Met	Gly	Lys	Ile	Cys	Gly
65					70					75					80

Val	Ser	Ile	Val	Arg	Ala	Gly	Glu	Ser	Met	Glu	Gln	Gly	Leu	Arg	Asp
				85					90					95	

Cys	Cys	Arg	Ser	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	Ile	Leu	Ile	Gln	Arg	Asp	Glu
			100					105					110		

Glu	Thr	Ala	Leu	Pro	Lys	Leu	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	Pro	Glu	Asp	Ile
		115					120					125			

Ser	Glu	Arg	Tyr	Val	Phe	Leu	Leu	Asp	Pro	Met	Leu	Ala	Thr	Gly	Gly
	130					135					140				

Ser	Ala	Ile	Met	Ala	Thr	Glu	Val	Leu	Ile	Lys	Arg	Gly	Val	Lys	Pro
145					150					155					160

Glu	Arg	Ile	Tyr	Phe	Leu	Asn	Leu	Ile	Cys	Ser	Lys	Glu	Gly	Ile	Glu
				165					170					175	



Lys Tyr His Ala Ala Phe Pro Glu Val Arg Ile Val Thr Gly Ala Leu  
                             180                            185                            190

Asp Arg Gly Leu Asp Glu Asn Lys Tyr Leu Val Pro Gly Leu Gly Asp  
                             195                            200                            205

Phe Gly Asp Arg Tyr Tyr Cys Val  
                             210                            215

<210> 2

<211> 373

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 2

Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp  
                             1                            5                            10                            15

Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Ala Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro  
                             20                            25                            30

Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg  
                             35                            40                            45

Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu  
                             50                            55                            60

Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys  
                             65                            70                            75                            80

Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly  
                             85                            90                            95

Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Val Gly Glu Asn Val  
                             100                            105                            110

Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu  
                             115                            120                            125

Val Val Val Val Asp Asp Glu Arg Cys Lys Lys Ile Met Lys Gln Phe  
                             130                            135                            140

Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu Ala Ser  
                             145                            150                            155                            160

Glu Pro Phe Lys Asn Val Tyr Leu Leu Pro Gln Thr Asn Gln Leu Leu  
                             165                            170                            175

Gly Leu Tyr Thr Ile Ile Arg Asn Lys Asn Thr Thr Arg Pro Asp Phe  
                             180                            185                            190

Ile Phe Tyr Ser Asp Arg Ile Ile Arg Leu Leu Val Glu Glu Gly Leu  
                             195                            200                            205

Asn His Leu Pro Val Gln Lys Gln Ile Val Glu Thr Asp Thr Asn Glu  
                             210                            215                            220

Asn Phe Glu Gly Val Ser Phe Met Gly Lys Ile Cys Gly Val Ser Ile  
225 230 235 240  
Val Arg Ala Gly Glu Ser Met Glu Gln Gly Leu Arg Asp Cys Cys Arg  
245 250 255  
Ser Val Arg Ile Gly Lys Ile Leu Ile Gln Arg Asp Glu Glu Thr Ala  
260 265 270  
Leu Pro Lys Leu Phe Tyr Glu Lys Leu Pro Glu Asp Ile Ser Glu Arg  
275 280 285  
Tyr Val Phe Leu Leu Asp Pro Met Leu Ala Thr Gly Gly Ser Ala Ile  
290 295 300  
Met Ala Thr Glu Val Leu Ile Lys Arg Gly Val Lys Pro Glu Arg Ile  
305 310 315 320  
Tyr Phe Leu Asn Leu Ile Cys Ser Lys Glu Gly Ile Glu Lys Tyr His  
325 330 335  
Ala Ala Phe Pro Glu Val Arg Ile Val Thr Gly Ala Leu Asp Arg Gly  
340 345 350  
Leu Asp Glu Asn Lys Tyr Leu Val Pro Gly Leu Gly Asp Phe Gly Asp  
355 360 365  
Arg Tyr Tyr Cys Val  
370

<210> 3  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 3  
ggcagccaga attccttccg gggtcac

26

<210> 4  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 4  
ggctgtcagt ggggatctag aagtggag

28

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
30 novembre 2000 (30.11.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 00/71078 A3**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: C12N 15/54,  
15/12, A61K 48/00, 38/17, 38/45, A61P 35/00, 31/12 //  
(A61K 38/45, 38:17)

Philippe [FR/FR]; 3, rue Kirschleger, F-67000 Stras-  
bourg (FR). JUND, Richard [FR/FR]; 42, rue de Soultz,  
F-67100 Strasbourg (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/01422

(74) Mandataire: CABINET GERMAIN ET MAUREAU;  
Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).

(22) Date de dépôt international: 25 mai 2000 (25.05.2000)

(81) États désignés (*national*): AU, CA, JP, US.

(25) Langue de dépôt: français

(84) États désignés (*régional*): brevet européen (AT, BE, CH,  
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE).

(26) Langue de publication: français

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

(30) Données relatives à la priorité:  
99/06892 25 mai 1999 (25.05.1999) FR

(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale: 19 avril 2001

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*): TRANS-  
GENE [FR/FR]; 11, rue de Mosheim, F-67000 Strasbourg  
(FR).

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.*

(72) Inventeurs; et  
(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): ERBS,

(54) Title: COMPOSITION DESIGNED FOR IMPLEMENTING AN ANTITUMORAL OR ANTIVIRAL TREATMENT IN A MAMMAL

(54) Titre: COMPOSITION DESTINÉE A LA MISE EN OEUVRE D'UN TRAITEMENT ANTITUMORAL OU ANTIVIRAL CHEZ UN MAMMIFÈRE

(57) Abstract: The invention concerns a composition for implementing an antitumoral or antiviral treatment in a mammal comprising: (i) a nucleic acid sequence coding for all or part of polypeptide p53; (ii) at least a nucleic acid sequence coding for all or part of a polypeptide having at least a cytotoxic activity, said nucleic acid sequences being placed under the control of elements required for their expression in a host cell of said mammal.

(57) Abrégé: La présente invention concerne une composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement antitumoral ou antiviral chez un mammifère comprenant: (i) une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie du polypeptide p53, (ii) au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique, lesdites séquences d'acide nucléique étant placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte dudit mammifère.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/FR 00/01422

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/54 C12N15/12 A61K48/00 A61K38/17 A61K38/45  
 A61P35/00 A61P31/12 //(A61K38/45, A61K38:17)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
------------	--	-----------------------

X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!            BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,            PHILADELPHIA, PA, US;            February 1998 (1998-02)            XU M ET AL: "Gene therapy with p53 and a            fragment of thrombospondin I inhibits            human breast cancer in vivo."            Database accession no. PREV199800259754            XP002133391            abstract            &amp; MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM FEB.,            1998,            vol. 63, no. 2, February 1998 (1998-02),            pages 103-109,            ISSN: 1096-7192</p>	<p>1,2,            13-22,25</p>
---	--	-------------------------------------

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 November 2000

Date of mailing of the international search report

01/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No  
PCT/AR 00/01422

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>YANG B ET AL: "Wild-type p53 protein potentiates cytotoxicity of therapeutic agents in human colon cancer cells." CLINICAL CANCER RESEARCH, (1996 OCT) 2 (10) 1649-57., XP002133390 page 1649 abstract</p> <p>---</p>	
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; October 1998 (1998-10) EHINGER MATS ET AL: "p53-dependent and -independent differentiation of leukemic U-937 cells: Relationship to cell cycle control." Database accession no. PREV199800491381 XP002133392 abstract &amp; EXPERIMENTAL HEMATOLOGY (CHARLOTTESVILLE) OCT., 1998, vol. 26, no. 11, October 1998 (1998-10), pages 1043-1052, ISSN: 0301-472X</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 96 16183 A (CAYLA) 30 May 1996 (1996-05-30) page 6, line 7 - line 28</p> <p>---</p>	
P,X	<p>US 6 030 956 A (BOULIKAS TENI) 29 February 2000 (2000-02-29)  column 10, line 6 -column 20, line 45</p> <p>-----</p>	1,2,6, 14-17, 21-23,25

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01422

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9616183	A	30-05-1996	US 5856153 A	05-01-1999
			AU 4180996 A	17-06-1996
			DE 69516166 D	11-05-2000
			DE 69516166 T	16-11-2000
			EP 0792369 A	03-09-1997
			ES 2146788 T	16-08-2000
US 6030956	A	29-02-2000	NONE	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/00/01422

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 C12N15/54 C12N15/12 A61K48/00 A61K38/17 A61K38/45  
A61P35/00 A61P31/12 //(A61K38/45, A61K38:17)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; février 1998 (1998-02) XU M ET AL: "Gene therapy with p53 and a fragment of thrombospondin I inhibits human breast cancer in vivo." Database accession no. PREV199800259754 XP002133391 abrégé &amp; MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM FEB., 1998, vol. 63, no. 2, février 1998 (1998-02), pages 103-109, ISSN: 1096-7192</p>	1,2, 13-22,25

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

**\* Catégories spéciales de documents cités:**

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 novembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

01/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sitch, W

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

internationale No

PCT/FR 00/01422

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>YANG B ET AL: "Wild-type p53 protein potentiates cytotoxicity of therapeutic agents in human colon cancer cells." CLINICAL CANCER RESEARCH, (1996 OCT) 2 (10) 1649-57., XP002133390 page 1649 abrégé</p>	
A	<p>---            DATABASE BIOSIS 'en ligne!            BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,            PHILADELPHIA, PA, US;            octobre 1998 (1998-10)            EHINGER MATS ET AL: "p53-dependent and -independent differentiation of leukemic U-937 cells: Relationship to cell cycle control." Database accession no. PREV199800491381 XP002133392 abrégé            &amp; EXPERIMENTAL HEMATOLOGY (CHARLOTTESVILLE) OCT., 1998, vol. 26, no. 11, octobre 1998 (1998-10), pages 1043-1052, ISSN: 0301-472X</p>	
A	<p>---            WO 96 16183 A (CAYLA)            30 mai 1996 (1996-05-30)            page 6, ligne 7 - ligne 28</p>	
P,X	<p>---            US 6 030 956 A (BOULIKAS TENI)            29 février 2000 (2000-02-29)            colonne 10, ligne 6 -colonne 20, ligne 45</p>	<p>1,2,6,            14-17,            21-23,25</p>



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/01422

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9616183 A	30-05-1996	US 5856153 A	05-01-1999
		AU 4180996 A	17-06-1996
		DE 69516166 D	11-05-2000
		DE 69516166 T	16-11-2000
		EP 0792369 A	03-09-1997
		ES 2146788 T	16-08-2000
US 6030956 A	29-02-2000	AUCUN	

**This Page Blank (uspto)**